

**MENSCHLICHES AKROSIN:
ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
MULTIPLER FORMEN**

Renate Mindermann

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549025_0070

M E N S C H L I C H E S A K R O S I N :
I S O L I E R U N G U N D C H A R A K T E R I S I E -
R U N G M U L T I P L E R F O R M E N

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie
und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Renate Mindermann

München

Mai 1981



1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 7. 1981

Diese Arbeit entstand unter Leitung von Prof.Dr. H.Fritz in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik der Universität München.

Herrn Prof.Dr. H.Fritz danke ich herzlich für seine großzügige Förderung dieser Arbeit und für seine ständige Bereitschaft und Hilfe.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Werner Müller-Esterl für zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskriptes; Frau Annemarie Oettl für die Hilfe bei den praktischen Arbeiten und bei den graphischen Zeichnungen; Herrn Heinz Leuchtgens für die Durchführung der Gelatinolyse und schließlich Frau Maria Meier für das mühevollen Tippen der Arbeit.

Zuallerletzt möchte ich aber meinem Mann und meinen beiden Kindern danken für das große Entgegenkommen und die Aufteilung der "Familienpflichten", denn ohne ihre Hilfe wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Arbeit anzufertigen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. ZUSAMMENFASSUNG	1
B. EINLEITUNG	5
B.1. Spermien, Bildung, Morphologie und Enzymausstattung des Akrosoms	5
B.2. Physiologische Aspekte der Befruchtung unter besonderer Berücksichtigung der Wirkung von Akrosin	7
B.2.1. Spermienmotilität	7
B.2.2. Kapazitation	8
B.2.3. Akrosomenreaktion	9
B.2.4. Penetration der Eihüllen	10
B.2.5. Dekondensation des Chromatingerüsts	15
B.3. Akrosin	16
B.3.1. Vorkommen und Lokalisation im Akrosom	16

	Seite
B.3.2. Extraktion und Reinigung	17
B.3.3. Substratspezifität	18
B.3.4. Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt und Strukturuntersuchungen	19
B.3.5. Immunologische Untersuchungen	19
B.3.6. Wechselwirkungen mit Amphiphilen	20
B.3.7. Nachweis von Akrosin im Spermatozoon und Regulation der Enzymaktivität	20
B.3.8. Akrosininhibitoren	23
B.3.9. Aufgabenstellung	25
C. ERGEBNISSE	26
C.1. Vorversuche zur Isolierung	26
C.1.1. Saure Extraktion und Abtrennung der Inhi- bitoren mit Hilfe der Gelchromatographie	26
C.1.2. Extraktion bei pH 5,5 mit 0,1% Triton X-100 und Chromatographie über CM-Sephadex C-50	27
C.2. Isolierung von Akrosin aus Humansperma	29

	Seite
C.2.1. Sammlung und Extraktion der Spermien	29
C.2.2. Chromatographie an SP-Sephadex C-50	30
C.2.3. Chromatographie an p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose	32
C.2.4. Trennung multipler Formen durch präparative Polyacrylamidgel-Elektrophorese	33
C.2.4.1. Ausarbeitung der optimalen Elektrophorese- und Extraktionsbedingungen	33
C.2.4.2. Präparative Elektrophorese	35
C.2.4.3. Entsalzung und Entfernung von Detergentien	38
C.3. Versuche zur chromatographischen Trennung multipler Akrosinformen	41
C.3.1. Elution mittels eines pH-Gradienten von p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose	41
C.3.2. Rechromatographie an SP-Sephadex C-50	41
C.3.3. Chromatographie an CM-Sepharose CL-6B	44
C.3.4. Chromatographie an Sephadex G-75	45
C.4. Reinheitsprüfungen und Charakterisierung	47
C.4.1. Proteingehalt und spezifische Aktivität	47
C.4.2. Elektrophoresen	47
C.4.2.1. Disk-Elektrophoresen	47
C.4.2.2. Isoelektrische Fokussierung	48

	Seite
C.4.2.3.	SDS-Elektrophorese 48
C.4.3.	Aminosäurezusammensetzung 51
C.4.4.	Substratspaltung und Bestimmung der K_M -Werte 51
C.5.	Untersuchungen zur Bildung multipler Akrosinformen 55
C.5.1.	Inkubation des Rohextraktes 59
C.5.2.	Inkubation von partiell gereinigtem Akrosin (SP-Sephadex G-50-Eluat) 61
C.5.3.	Isolierung unter Zusatz von Benzamidiniumchlorid 63
C.5.4.	Umwandlung von Akrosin c in Akrosin d 65
D.	MATERIAL UND METHODEN 67
D.1.	Apparate 67
D.2.	Substanzen 68
D.2.1.	Substrate 68
D.2.2.	Materialien für die Säulenchromatographie 68

	Seite
D.2.3. Materialien für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese	68
D.2.4. Andere Materialien	69
D.3. Methoden	69
D.3.1. Enzym- und Hemmtests	69
D.3.1.1. Bz-Arg-OEt/ADH-System	69
D.3.1.2. Ac-Pne-Arg-OEt/ADH-System	70
D.3.1.3. Bz-Arg-NHNp-System	70
D.3.1.4. Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-NHNp·HCl-System	70
D.3.2. Isolierung von Humanakrosin	71
D.3.2.1. Sammlung und Extraktion der Spermien	71
D.3.2.2. Chromatographie an SP-Sephadex C-50	72
D.3.2.3. Chromatographie an p-Aminobenzamidin-CH-Sephadex	72
D.3.2.4. Präparative Polyacrylamidgel -Elektrophorese	73
D.3.2.5. Entsalzung und Entfernung der Detergentien	74
D.3.2.6. Versuche zur chromatographischen Trennung multipler Formen des Akrosins	74
D.3.2.6.1. Elution im pH-Gradienten an p-Aminobenzamidin-CH-Sephadex	74
D.3.2.6.2. Rechromatographie an SP-Sephadex C-50	74
D.3.2.6.3. Chromatographie an CM-Sephadex CL-6B	75
D.3.2.6.4. Chromatographie an Sephadex G-75	75
D.3.3. Reinheitsprüfungen und Charakterisierungen	75
D.3.3.1. Elektrophoresen	75
D.3.3.1.1. Disk-Elektrophoresen	75
D.3.3.1.2. Isoelektrische Fokussierung	76
D.3.3.1.3. SDS-Elektrophoresen	77
D.3.3.2. Aminosäureanalysen	78
D.3.3.3. Proteinbestimmung	78
D.3.3.4. Bestimmung von Triton X-100	78

D.3.4.	Untersuchungen zur Bildung multipler Formen in vitro	79
D.3.4.1.	Inkubation des Rohextraktes	79
D.3.4.2.	Inkubation des SP-Sephadex C-50-Eluates	79
D.3.4.3.	Isolierung unter Zusatz von Benzamidinium-chlorid	79
D.3.4.4.	Inkubationsversuche zur Stabilität von Akrosin c	80
E.	DISKUSSION	81
E.1.	Isolierung	31
E.2.	Charakterisierung	84
E.3.	Multiple Formen	89
	LITERATURVERZEICHNIS	92
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	101
	LEBENS LAUF	102

A. ZUSAMMENFASSUNG

A.1. Isolierung von Humanakrosin

A.1.1. Isolierung multipler Formen

Humanakrosin wurde aus Sperma isoliert, das bei -30°C gelagert worden war. Dazu wurden die Spermien bei pH 5,5 in Gegenwart von Detergentien extrahiert. Die Akrosin-Inhibitoren konnten durch Chromatographie an SP-Sephadex C-50 in schwach saurem Medium quantitativ von Akrosin abgetrennt werden. Nach Chromatographie an p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose wurde reines Akrosin erhalten, das sich bei der Disk-Elektrophorese in drei enzymatisch aktive "multiple" Formen, Akrosin b,c und d, auftrennte. Die spezifische Aktivität lag bei ca. 120 U (Bz-Arg-OEt/ADH) /mg Gesamtprotein. Die Ausbeute an aktivem Akrosin betrug ca. 44% bei einer 762fachen Anreicherung.

A.1.2. Auftrennung multipler Formen

Durch chromatographische Methoden war keine Separierung der multiplen Formen möglich. Die Auftrennung erfolgte daher mittels präparativer Polyacrylamidgel-Elektrophorese bei pH 3,8 unter Zusatz von 0,25% Triton X-100 zum Gel. Nach Extraktion der drei separierten Akrosin-Formen aus dem Gel erfolgte Entsalzung durch Ultrafiltration, Entfernung der Detergentien durch Ausschütteln mit Essigsäureäthylester und Lyophilisation der Proteininlösungen. Die spezifische Aktivität für Akrosin c betrug

ca. 82 U (Bz-Arg-OEt/ADH)/mg Protein. Die Ausbeute bei der präparativen Elektrophorese einschließlich der Entsalzung und Entfernung der Detergentien lag bei ca. 20% (bezogen auf das Ausgangsmaterial) für die Hauptkomponente Akrosin c.

A.2. Reinheitsprüfungen und Charakterisierung

A.2.1. Disk-Elektrophorese

In der Disk-Elektrophorese fanden sich für die drei multiplen Akrosin-Formen b, c und d je eine Proteinbande unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität, die alle enzymatisch aktiv waren.

A.2.2. Isoelektrische Fokussierung

Mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung wurde der isoelektrische Punkt für Akrosin c und d zu 10,5 bestimmt.

A.2.3. Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichte, mittels SDS-Elektrophorese bestimmt, lagen für die native Akrosin-Form b bei $\sim 53\,000$, c bei $\sim 39\,000$ und d bei $\sim 34\,000$. In der Gelchromatographie wurde das Molekulargewicht für Akrosin c zu $45\,000 \pm 3\,000$ und für Akrosin d zu $40\,000 \pm 3\,000$ ermittelt. Für reduziertes Akrosin c wurden Haupt-Fragmente mit MG $\sim 20\,000$, $\sim 16\,000$, $\sim 14\,000$ und $\sim 12\,000$ erhalten. Offensichtlich besitzt das Molekül interne Spaltstellen, die möglicherweise auf unspezifische Proteolyse während der Lagerung der Spermien zurückzuführen sind.

A.2.4. Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäurezusammensetzung von Akrosin c (343 Aminosäuren) wurde bestimmt. Sie weist große Ähnlichkeiten mit der des Akrosins aus Eber- und Widderspermatozoen auf.

A.2.5. Substratspaltung und Bestimmung der K_M -Werte

Die Akrosin-katalysierte Hydrolyse von Bz-Arg-OEt, Ac-Phe-Arg-OEt und Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA wurde untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Hydrolyse von Bz-Arg-OEt im kombinierten Bz-Arg-OEt/ADH-Test das empfindlichste und ökonomischste Nachweissystem für Humanakrosin darstellt. Die Michaelis-Konstante K_M beträgt für das Substrat Bz-Arg-OEt $5,7 \times 10^{-5}$ mol/l, für Ac-Phe-Arg-OEt $1,0 \times 10^{-4}$ mol/l (gemessen mittels des kombinierten NAD^+ /ADH-Systems) und für Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA $4,0 \times 10^{-4}$ mol/l.

A.3. Untersuchungen zur Bildung der multiplen Akrosin-Formen in vitro

A.3.1. Rohextrakt

Die Zusammensetzung des Rohextraktes ist im Hinblick auf multiple Formen nicht konstant. Akrosin a, b und c werden einzeln oder in Kombination miteinander gefunden. Die Zusammensetzung ist abhängig von dem verwendeten Spermatomaterial und vom pH-Wert des Rohextraktes. Akrosin a stellt eine aktive Form mit der geringsten elektrophoretischen Mobilität aller Akrosin-Formen dar.

Bei der Umwandlung der Akrosin-Formen konnte eine pH-Abhängigkeit beobachtet werden. Bei höheren pH-Werten erfolgt die Transformation von Akrosin a oder b in Akrosin c rascher. Im Rohextrakt wird keine Bildung von Akrosin c beobachtet.

A.3.2. Partiell gereinigtes Akrosin (SP-Sephadex G-50-Eluat)

Die Bildung von Akrosin c und d aus Akrosin b ist wiederum pH-abhängig. Bei höherem pH-Wert wird mit zunehmender Inkubationsdauer Akrosin b in Akrosin c und d umgewandelt.

A.3.3. Stabilität von Akrosin c

Die Umwandlung von Akrosin c in Akrosin d erfolgt bei pH 5,5 langsam. Triton X-100, Ca^{++} oder EDTA haben auf die Bildung von Akrosin d offensichtlich keinen hemmenden Einfluß, hingegen kann die Transformation durch Benzamidin gehemmt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die multiplen Formen von Humanakrosin Zwischenstufen einer Proenzymaktivierung darstellen bzw. proteolytisch modifizierten Enzymen entsprechen. Die Umwandlung erfolgt in Richtung Akrosin $a \rightarrow b \rightarrow c \rightarrow d$. Hierbei repräsentiert Akrosin c die aktive Form, während Akrosin b bzw. Akrosin d als höhermolekulare Vorstufe bzw. niedermolekulares Abbauprodukt von Akrosin zu betrachten ist. Über die Natur von Akrosin a kann z.Zt. noch keine Aussage gemacht werden.

B. EINLEITUNG

B.1. Spermien, Bildung, Morphologie und Enzymausstattung des Akrosoms

Die Spermien werden in den Tubuli seminiferi des Hoden aus den Spermatogonien durch Teilung gebildet, in der rete testis gesammelt und in die Nebenhoden transportiert, wo sie bis zur Ejakulation in der cauda epididymis gelagert werden. Während der Lagerung im Nebenhoden treten bereits eine Reihe von morphologischen Veränderungen auf, die besonders die Plasmamembran der Spermien betreffen. Man kann eine verstärkte Fluidität beobachten, die bedingt ist durch den Verlust an bestimmten Membranlipiden (Phosphatidylcholin und Cholesterol) und die Zunahme von ungesättigten Fettsäuren in den Membranphosphatiden (16-21). Während der Lagerung der Spermien im Nebenhoden wird außerdem die Membranoberflächenladung durch die Anlagerung von sauren Gruppen negativer (22,23).

Die Spermien sind ca. 60 μm lange, bewegliche Zellen. Sie bestehen aus Kopf- und Schwanzteil. In Abb.1 ist der Kopfteil eines Spermiums dargestellt. Er besteht im wesentlichen aus dem Zellkern mit einem haploiden Chromosomensatz. Das Akrosom ist aus einer inneren und einer äußeren akrosomalen Membran aufgebaut, die beide im Äquatorialen Raum ineinander übergehen. Beide Membranen schließen den sog. akrosomalen Raum ein. Der hintere Teil des Kopfes wird als postakrosomale Region bezeichnet. Das Äquatorialsegment trennt postakrosomale Region und Akrosom. Auffällig ist, daß die äußere Akrosomenmembran in Richtung des Äquatorialsegmentes dünner wird. Das gesamte Spermium wird schließlich von einer Plasmamembran umhüllt.

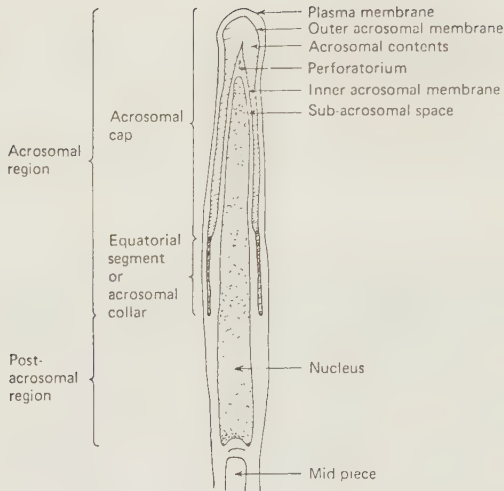


Abb.1 Schematische Darstellung des Spermienkopfes nach Morton (25)

Acrosomal region (akrosomale Region); Postacrosomal region (postakrosomale Region); Acrosomal cap (Akrosomenkappe); Equatorial segment or acrosomal collar (Äquatorialssegment oder Akrosomenhals); Plasma membrane (Plasmamembran); outer acrosomal membrane (äußere akrosomale Membran); Acrosomal contents (akrosomaler Inhalt); inner acrosomal membrane (innere akrosomale Membran); Sub-acrosomal space (subakrosomaler Raum); Nucleus (Kern); Mid piece (Zwischenstück);

Das Akrosom kann als modifiziertes Lysosom angesehen werden (24,25). Drei Gründe sprechen für diese Hypothese:

1. Das Akrosom wird während der Spermatogenese vom Golgi-Apparat abgeschnürt.
2. Das Akrosom färbt sich mit dem Lysosomen-spezifischen Farbstoff Acridin orange-rot an.
3. Das Akrosom enthält typische lysosomale Markerenzyme (25), z.B. Phosphatasen, Glukosidasen und Proteasen.

Im Unterschied zu den Lysosomen, die Enzyme mit überwiegend saurem pH-Optimum enthalten, fand man im Akrosom auch Enzyme, die ihr Wirkungsoptimum im alkalischen Bereich haben.

B.2. Physiologische Aspekte der Befruchtung unter besonderer Berücksichtigung der Wirkung von Akrosin

B.2.1. Spermienmotilität

Die Spermien wandern nach der Ablagerung in der Ampulla vaginæ durch den weiblichen Genitaltrakt (Uterus, Tuben), bis sie im pars ampullaris des Eileiters eine Oocyte erreichen.

Untersuchungen von Schill et al. (26-28) sprechen für die Beteiligung proteolytischer Enzyme an der Stimulierung der Spermatozoenmotilität. Dafür in Frage kommen unter anderem Enzyme des Kallikrein-Kinin-Systems, die Kinine aus Kininogenen durch limitierte Proteolyse freisetzen. Der kontraktionsauslösende Einfluß der Kinine auf die glatte Muskulatur des Uterus ist bekannt (29). Damit ist möglicherweise auch eine Beeinflussung des Spermatozoentransportes im weiblichen Genitaltrakt verbunden (30). In vitro-Untersuchungen haben gezeigt, daß Kinine auch eine signifikante Steigerung der Spermatozoenmotilität bewirken (26,28,31). Palm et al. (32) konnten kürzlich zeigen, daß Akrosin Bradykinin aus Kininogenen liberieren kann, also eine typische Kininogenase darstellt. Der der Motilitätssteigerung zugrunde liegende Mechanismus wird bei Palm et al. (32)

diskutiert. Demnach stimulieren die freigesetzten Kinine die Prostaglandinbiosynthese und somit das Adenylatcyclase-System mit c-AMP als Effektor.

Nach Schumacher et al. (33) ist Akrosin auch an der enzymatischen Hydrolyse des Zervixmukus beteiligt, die zu einer Verringerung der Viskosität des Zervixschleims führt. Die Autoren konnten zeigen, daß hohe Konzentrationen von Akrosininhibitoren (α_1 -Antitrypsin, Inter- α -Trypsininhibitor und Trasylol^(R)) eine signifikante Hemmung der Zervixmukuspenetration von Spermien in vitro hervorrufen.

In beiden Fällen, d.h. als spezifische Kininogenase und bei der unspezifischen Hydrolyse des Zervixmukus kann Akrosin nur dann wirksam werden, wenn das Akrosom nicht mehr intakt ist und Akrosin aus seinem biologischen Kompartiment herausdiffundieren kann. In diesem Zusammenhang ist bedeutungsvoll, daß von den ursprünglich etwa 10^9 ejakulierten Spermien nur ca. 100 Spermien die Eizelle erreichen. Die übrigen 10^7 Spermatozoen werden im Genitaltrakt phagozytiert, möglicherweise erst nach Zerstörung des Akrosoms (34).

B.2.2. Kapazitation

Ejakulierte Spermien besitzen noch nicht die Fähigkeit zur Befruchtung. Sie erlangen diese erst durch einen biochemischen Prozeß, der im Uterus- und Eileiterlumen erfolgt und etwa 5 bis 6 Stunden beansprucht. Morphologische Veränderungen an den Spermien sind dabei nicht feststellbar. Dieser Vorgang wurde von Chang und Austin unabhängig voneinander beschrieben und "Kapazitation" genannt (35,36).

Das Milieu der uterinen und tubulären Sekrete wirkt stimulierend auf den Prozeß der Kapazitation (37). In vitro-Inkubation mit Pronase, Trypsin, β -Glucuronidase oder Neuraminidase kann die Kapazitation induzieren (38-40), wobei offensichtlich ober-

flächenassoziierte Moleküle abgetrennt werden. Für eine Modifikation der Oberflächenstruktur spricht auch, daß kapazitierte Spermien nur noch bedingt Concanavalin A binden (41,42) und daß die negativen Gruppen der Plasmamembran, die während der Reifung in den Nebenhoden gebildet werden, bei kapazitierten Spermien nicht mehr nachgewiesen werden können (43).

Die Kapazitation der Spermatozoen stellt einen reversiblen Prozeß dar. Durch Inkubation mit Seminalplasma können die Spermatozoen wieder dekapazitieren, also befruchtungsunfähig gemacht werden. Eingehendere Untersuchungen über einen sog. "Dekapazitationsfaktor" aus dem Seminalplasma wurden von Bedford und Chang durchgeführt (44).

Über die biologische Funktion der Kapazitation gibt es verschiedene Ansichten. Zaneveld et al. (45) sind der Meinung, daß während der Kapazitation eine "Demaskierung" akrosomaler Enzyme durch die Entfernung der korrespondierenden Inhibitoren erfolgt, die an die Oberfläche der Spermienmembran gebunden sind. Gwatkin (37) vertritt die Ansicht, daß während der Kapazitation durch die Entfernung von Oberflächenproteinen eine Labilisierung der Plasmamembran erfolgt und diese dadurch zur Fusion mit der Oocytenmembran befähigt wird. Analoge Beobachtungen wurden bei der Virus-induzierten Fusion von Körperzellen gemacht, wozu eine vorherige Abspaltung von Glykoproteinen der Zelloberfläche Voraussetzung ist (45,46).

B.2.3. Akrosomenreaktion

In unmittelbarer Nähe des Eies spielt sich die sog. Akrosomenreaktion ab. Die morphologischen Veränderungen während der Akrosomenreaktion sind bei vielen Spezies elektronenmikroskopisch beschrieben worden (47-53). Es kommt dabei zu einer Fusion und Vesikulation von Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran. Die Vesikelbildung findet über dem vorderen Kopfteil des Spermiums statt, nicht hingegen im postakrosomalen Bereich. Sie

führt zu einer vollständigen Ablösung der äußeren akrosomalen Membran und zu einer Freisetzung des akrosomalen Inhaltes. Die innere akrosomale Membran ist nun die begrenzende Membran des Spermienkopfes.

Yanagimachi et al. (54,55) stellten fest, daß die Akrosomenreaktion Ca^{++} -abhängig ist, analog der Fusion von somatischen Zellen (46). Der Trigger-Mechanismus der Reaktion ist noch unbekannt. Die Akrosomenreaktion kann durch Ionophore (z.B. A-23187), die Ca^{++} durch die Membran schleusen, ausgelöst werden (56,57,61), während Ca^{++} -Antagonisten (z.B. La^{+++}) diese Reaktion hemmen.

Meizel et al. (56,58) postulieren, daß Akrosin an der Auslösung der Akrosomenreaktion mitbeteiligt ist, da niedermolekulare Inhibitoren wie p-Aminobenzamidin, Benzamidin, NPGB und TLCK die Akrosomenreaktion hemmen. Inhibitoren mit höherem Molekulargewicht wie SBTI und der Trypsininhibitor aus Limabohnen bewirken keine Hemmung. Eine Erklärung hierfür ist, daß nur die niedermolekularen Inhibitoren in die akrosomalen Membranen eindringen und eine intra-akrosomale Hemmung von Akrosin hervorrufen können. Eine interessante elektronenmikroskopische Beobachtung bei der Hemmung der Akrosomenreaktion durch Inhibitoren zeigt, daß die Vesikulation der äußeren Membran durch Akrosininhibitoren nicht beeinflusst wird, wohl aber die Dispersion der akrosomalen Matrix (56,57,59).

Eine Ca^{++} -abhängige ATP-ase Aktivität ist in Spermatozoen von Säugetieren beschrieben worden (54,60), es fehlt aber bislang jeder Beweis, daß dieses Enzym eine Rolle beim Ca^{++} -Transport in das Akrosom spielt.

B.2.4. Penetration der Eihüllen

In den Abb.2 - 4 (62) ist schematisch dargestellt, wie das Spermatozoon die verschiedenen Eihüllen zu durchdringen vermag. Abb.

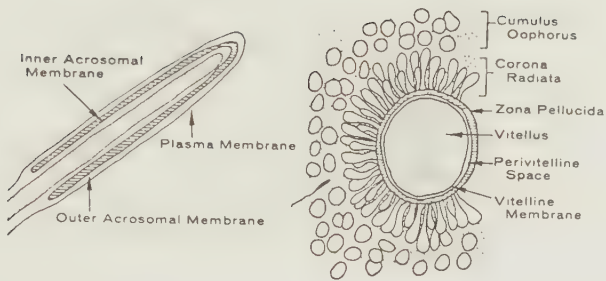


Abb.2 Status des kapazitierten Spermiums (links) und Penetration des Cumulus oophorus (rechts) nach McRorie et al. (62)

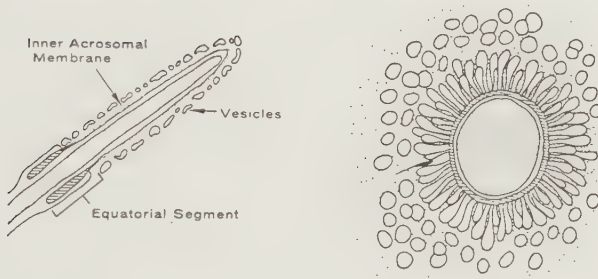


Abb.3 Akrosomenreaktion des Spermiums (links) und Penetration der Corona radiata (rechts) nach McRorie et al. (62)

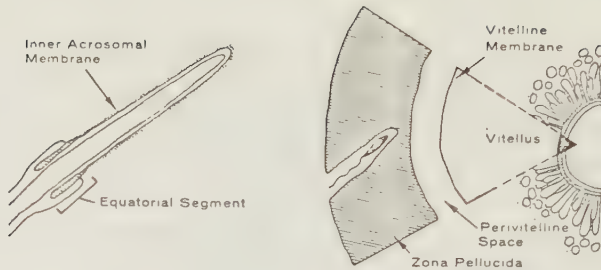


Abb.4 Spermium nach der Akrosomenreaktion (links) und Penetration der Zona pellucida (rechts) nach McRorie et al. (62)

2 zeigt ein kapazitiertes Spermatozoon in der Nähe des Eies. Die Plasmamembran und die äußere akrosomale Membran sind bereits labilisiert (s. B.2.2.); dadurch kann Hyaluronidase aus dem Akrosom freigesetzt werden, die die Hyaluronsäure-haltige Kittsubstanz zwischen den Cumulus oophorus Zellen hydrolisiert. Hyaluronidase ist eine Endoglykosidase, die 1,4- β -N-Acetylglukosamid-Bindungen in Hyaluronsäure spaltet. Hyaluronidase wurde von den Testes verschiedener Spezies wie Bulle (64-68), Widder (69,70) und Kaninchen (67,71) isoliert. Sie hat ein Molekulargewicht von ca. 60 000 und besteht aus 4 Untereinheiten. Ihr pH-Optimum liegt zwischen 3,8 und 4,5. Spermienhyaluronidase unterscheidet sich von lysosomaler Hyaluronidase anderer Gewebe, die jedoch ein ähnliches pH-Optimum aufweisen (72-74).

Antikörper gegen gereinigte Spermienhyaluronidase vermögen die Befruchtung in vitro zu blockieren (63). Bei dieser Hemmung handelt es sich offensichtlich um einen speziesspezifischen Prozeß.

In Abb.3 ist das Eindringen des Spermiums in die Corona radiata schematisch dargestellt. Die Akrosomenreaktion findet statt (s. B.2.3.); die Plasmamembran und die äußere akrosomale Membran vesikulieren und die innere akrosomale Membran wird zur Grenzmembran des Spermienkopfes. Für den Durchtritt durch die Interzellulärsubstanz der Corona radiata scheint das sog. Corona penetrating Enzyme (CPE) mitverantwortlich zu sein.

CPE wurde von Zaneveld et al. (75) aus Bullen- und Kaninchen-spermien angereichert. Es ist ein hitzelabiles Enzym mit einem pH-Optimum von 7,7, das durch den Dekapazitierungsfaktor (s. B.2.2.) des Seminalplasmas reversibel gehemmt werden kann. Tillmann (75) konnte im Seminalplasma eine ähnliche Enzymaktivität, die dem CPE entspricht, nachweisen.

Beim Durchtritt des Spermiums durch die Zona pellucida (Abb.4) sind im akrosomalen Bereich weder Plasmamembran noch Vesikel vorhanden, sondern nurmehr die innere Akrosomenmembran als neue Grenzmembran. Das Spermium schiebt sich in einem engen Kanal durch die Zona pellucida (48,91).

Die Zona pellucida besteht aus sauren und neutralen Glykoproteinen; den Hauptbestandteil stellen dabei vier Strukturproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 65 000 dar (77,78). Stambaugh und Buckley stellten schon 1969 (79) fest, daß eine proteolytische Aktivität im Extrakt von Kaninchen-spermien die Zona pellucida von Kaninchen-eiern auflösen kann. Das in seiner Wirkungsspezifität dem Akrosin sehr ähnliche Trypsin vermag die Zona pellucida in vitro ebenfalls aufzulösen (84). Akrosininhibitoren wie Sojabohnen-Trypsininhibitor, TLCK und NPGH hemmen die Befruchtung in vitro und in vivo (80-83).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, daß die biologische Funktion der Spermienproteinase Akrosin in der Proteolyse der Zona pellucida besteht. Für dieses Postulat sprechen eine Reihe von direkten und indirekten Befunden, ein schlüssiger Beweis steht noch aus. Einige Arbeiten setzen sich

auch kritisch mit dieser Hypothese auseinander; so stellte Bedford (85) fest, daß die Behandlung von Kanincheneiern mit Weizenkeimagglutinin die Zona pellucida resistenter gegenüber dem proteolytischen Abbau durch Trypsin und Akrosin macht. Trotzdem werden die derart behandelten Eier genauso schnell durch Spermien befruchtet wie die unbehandelten. Der Autor schließt daraus, daß die Proteolyse der Zona pellucida durch Akrosin nur von untergeordneter Bedeutung bei der Spermienpenetration ist. Ebenso merkt Gwatkin kritisch an (86), daß die bei den Fertilisationsversuchen verwendeten Inhibitorkonzentrationen ungewöhnlich hoch gewählt wurden, so daß eine unspezifische cytotoxische Wirkung der Inhibitoren eine Verringerung der Spermienmotilität bewirkt haben könnte und dadurch die Befruchtung unterblieb. Bei den Fertilisations-Experimenten wurde auch nicht überprüft, ob eine Hemmung auf der Stufe der Akrosomenreaktion oder bei der Penetration der Zona pellucida auftrat. Trotz dieser kritischen Anmerkungen ist jedoch die Hypothese von der Zona pellucida-Lysis durch Akrosin heute allgemein akzeptiert.

Wie geht nun die Spermienpenetration durch die Zona pellucida im Detail vor sich? In vitro Versuche mit Hamsterspermatozoen zeigten (87,88), daß die Anhaftung der Spermatozoen an die Zona pellucida sich in Stufen vollzieht. Zunächst werden die Spermien nur relativ locker gebunden; dieser Schritt ist reversibel und nicht spezies-spezifisch. Anschließend tritt eine feste Anheftung der kapazitierten Spermatozoen an die Spermien-Rezeptoren der Zona pellucida ein. Dieser Prozeß ist irreversibel und spezies-spezifisch. Die Rezeptoren für die Bindung der Spermien an die Zona pellucida sind sensitiv gegenüber Trypsin-, Chymotrypsin- oder Akrosinbehandlung (89,90). Die Passage des Spermiums durch die Zona pellucida dauert ca. 20 Minuten, wobei ein schmaler Penetrationskanal durch das Spermatozoon gebildet wird (48,91).

Nach erfolgter Zona-Penetration tritt das Spermium in den perivitellinen Raum über, um danach die Vitellinmembran zu durchdrin-

dringen. Dazu bindet es sich mit dem postakrosomalen Teil der Plasmamembran an die Vitellinmembran; nachfolgend kommt es zur Fusion der beiden Membranen. Durch diese Fusion sind alle wesentlichen Teile des Spermiums wie Kern, Mitochondrien und kontraktile Elemente in die Eizelle übergetreten.

Unmittelbar nach der Fusion eines Spermiums mit der Eizelle kommt es zur sog. Zona-Reaktion und Vitellin-Reaktion, die eine Mehrfachbefruchtung verhindern sollen. Der Kontakt der Spermien mit der Vitellinmembran führt zur Freisetzung des Inhaltes der corticalen Granula der Eizelle in den perivitellinen Raum. Dieser Prozeß bewirkt eine noch nicht näher definierte Veränderung der Zona pellucida bzw. der Vitellinmembran in der Weise, daß keine Spermien mehr durch die innere Eihülle penetrieren können.

B.2.5. Dekondensation des Chromatingerüstes

Eine weitere Hypothese hinsichtlich der biologischen Funktion von Akrosin betrifft die Auflösung des chromosomalen Chromatingerüstes. Marushige et al. (92,93) fanden, daß eine trypsinähnliche Proteinase aus Bullenspermatozoen in vitro die Dekondensation der Histone auslösen kann, die in vivo bei der Bildung des männlichen Pronukleus im Cytoplasma des Ovums abläuft. Die dafür verantwortliche Protease konnte mit Hilfe von NaCl, Harnstoff und 2-Merkaptoäthanol von isoliertem Chromatin abgelöst werden. Eine nähere Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften und der elektrophoretischen Mobilität lassen den Schluß zu, daß es sich bei der Dekondensationsprotease um Akrosin handelt. Inhibitoren wie Sojabohnen-Trypsininhibitor und Benzamidin hemmen die Proteolyse der Histone in vitro.

Bullenspermatozoen, die keine Plasma- und äußere Akrosomenmembran mehr besitzen, sind noch im Stande, Chromatin abzubauen. Wäscht man die Spermien zuvor mit 0,1 M CaCl_2 -Lösung (Akrosin wird hierbei nahezu quantitativ abgelöst), so ist der Chromatin-

abbau deutlich verlangsamt. Nach dem Waschen mit Hyamin 2389 (Akrosin wird dabei quantitativ abgelöst) kann kein Chromatinabbau mehr festgestellt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Akrosin isolierte Histone ebenfalls degradiert. Nach Young (94) ist an der Chromatindekondensation eine Protease beteiligt, die im Akrosom lokalisiert ist. Nach Entfernung des Akrosoms mit 2,05 M Sacharoselösung kann keine Dekondensation mehr festgestellt werden.

B.3. Akrosin (EC 3.4.21.10)

B.3.1. Vorkommen und Lokalisation im Akrosom

Akrosin wurde in verschiedenen Vertebratenklassen wie Säugetieren, Vögeln (95,96) und Amphibien (97,98) gefunden. Eine Akrosin-ähnliche Proteinase wurde auch aus Seeigelspermien (99,100) isoliert. Offensichtlich ist Akrosin ein evolutionsgeschichtlich sehr altes Enzym, dem eine wichtige physiologische Rolle zukommt. Akrosin wurde bisher isoliert aus Spermien der Spezies Eber (4, 101-103), Bulle (104,105), Widder (106,107), Kaninchen (108,109) und Mensch (110-113, 154). Eberakrosin ist bislang biochemisch am besten charakterisiert.

Akrosin konnte mittels verschiedener Methoden im Akrosom der Spermien nachgewiesen werden. Zunächst fanden Stambaugh und Buckley (79) nach Fraktionierung von Spermatozoen die Akrosinaktivität in der Akrosomenfraktion. Brown und Hartree (114) stellten fest, daß Spermatozoen, von denen die Plasma- und äußere akrosomale Membran entfernt worden war, noch ca. 70% der Akrosinaktivität unbehandelter Spermien besitzen. Aus dieser Beobachtung und unter Berücksichtigung der biologischen Funktion für Akrosin bei der Zona pellucida-Penetration schlossen sie, daß Akrosin an der inneren akrosomalen Membran lokalisiert

sein müßte. Mit anderen exakteren Methoden wie der Immunfluoreszenz mittels markierten Akrosin-Antikörpern (115-118) und der Reaktion des Akrosoms mit fluoreszenzmarkierten Inhibitoren (die mit Akrosin einen Enzym-Inhibitor-Komplex bilden) (119-121) wurde Akrosin ebenfalls im Akrosom lokalisiert. Da bei den verwendeten Techniken eine transversale Diffusion von Akrosin in vitro jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, ist die subzelluläre Lokalisation von Akrosin nach wie vor strittig. Allgemein geht man allerdings von der Annahme aus, daß Akrosin an der inneren akrosomalen Membran lokalisiert ist.

B.3.2. Extraktion und Reinigung

Zur Extraktion bieten sich verschiedene Verfahren an. Als optimale Methode erwies sich bei Eberspermien die Extraktion mit 2% Essigsäure (pH 2,6) nach vorhergehendem Frieren und Tauen der Spermien (4), beim Menschen 2% Essigsäure unter Zusatz von 10% Glycerin (110,122,124), beim Bullen und Widder 2 M $MgCl_2$ (106) oder die saure Extraktion (114). Häufig werden auch Detergentien wie Triton X-100 oder Hyamin 2389 zur Extraktionslösung zugesetzt (111,123).

Isoliert wurde Akrosin mit Hilfe konventioneller chromatographischer Techniken wie Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie und Affinitätschromatographie. Als Liganden bei der Affinitätschromatographie dienten Sojabohnen-Trypsininhibitor (1), p-Aminobenzamidin (4,102) oder p-(p'-Aminophenoxypropoxy)-benzamidin (107). Akrosin wird dabei bei neutralem pH-Wert gebunden und in saurem Milieu (pH 3,0) eluiert. Da Akrosin Kohlehydratseitenketten besitzt, konnte es an Concanavalin A-Sepharose gereinigt werden (125). Akrosin besitzt offensichtlich auch hydrophobe Eigenschaften und wird an hydrophobe Matrices wie Phenyl-Sepharose (4) oder p-(Phenoxypropoxy)-anilin, gekoppelt an Sepharose (107), gebunden.

Die Elektrophoresemuster der gereinigten Produkte in Polyacrylamidgelen zeigen beim Eber- und Widderakrosin im wesentlichen eine Bande, die enzymatisch aktiv ist. Beim Humanakrosin werden meist drei oder vier enzymatisch aktive Proteinbanden erhalten.

B.3.3. Substratspezifität

Akrosin ist eine Proteinase mit Trypsin-ähnlicher Spaltungsspezifität, die selektiv Arginyl- und Lysylbindungen zu spalten vermag. Während Polakoski (127) eine bevorzugte Spaltung von Arginylbindungen beobachtete, stellten Schiessler et al. (126) eine nahezu identische Spaltungsgeschwindigkeit von Arginyl- und Lysylbindungen in der Insulin-B-Kette und RCM-Ribonuklease durch Akrosin (Eber) bzw. Trypsin (Rind) fest.

Akrosin spaltet synthetische Trypsinsubstrate wie Bz-Arg-OEt, Bz-Arg-NHNp oder Tos-Arg-OMe. Allgemein kann man sagen, daß Argininester oder -amide als Substrate erkannt werden. Zur Bestimmung von Humanakrosin eignet sich am besten die Spaltung von Bz-Arg-OEt. Als ein sehr empfindliches Testsystem hat sich die Kopplung der Bz-Arg-OEt-Spaltung mit dem Alkoholdehydrogenase/Nikotinamid-adenindinukleotid (ADH/NAD⁺)-System erwiesen (1,128). Das pH-Optimum für die Spaltung von Bz-Arg-OEt liegt zwischen pH 8,0 und 8,5 (111,125) und für die Bz-Arg-NHNp-Spaltung zwischen pH 7,5 und 7,8 (125).

Akrosin spaltet natürliche Substrate wie Azokasein, denaturiertes Hämoglobin, Gelatine, Fibrinogen, Ribonuklease und die B-Kette von Insulin (nach Morton (25)).

Aus der irreversiblen Hemmung des Akrosins mit Diisopropylfluorophosphat und Tosyl-lysyl-chlormethylketon geht hervor, daß im aktiven Zentrum des Enzyms ein Serinrest vorhanden ist und daß ein Histidinrest an der katalytischen Reaktion beteiligt ist. Akrosin gehört somit zur Klasse der Serin-Endoproteinasen.

B.3.4. Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt und Strukturuntersuchungen

Das Molekulargewicht von Eber- und Widderakrosin beträgt 38 000 (4,107). Für menschliches Akrosin gibt Gilboa et al. (111) 75 000 an, während Schleuning et al. (112) multiple Formen mit Molekulargewichten von 64 000, 38 000 und 25 000 fanden. Sämtliche Molekulargewichte wurden mittels SDS-Elektrophorese bestimmt.

Der isoelektrische Punkt für Eberakrosin liegt bei pH 10,5 (4) und für Kaninchenakrosin bei pH 10,2 (131).

Für Eber- und Widderakrosin sind Aminosäureanalysen durchgeführt worden (4,107). Die Analysenwerte der beiden Spezies zeigen große Ähnlichkeiten. Auffallend ist auch der hohe Prolinanteil im Molekül. Schleuning (112) gibt für Humanakrosin eine Aminosäurezusammensetzung für die 25 000 M.G.-Form an. Auffallend ist dabei die Ähnlichkeit zu menschlichem Trypsin. Stambaugh und Smith (108) wiesen ebenfalls auf die ähnliche Aminosäurezusammensetzung von Kaninchenakrosin (M.G. 22 000) und menschlichem Trypsin hin. Der Kohlehydratanteil beträgt beim Eberakrosin 8,2% (4) und beim Widderakrosin 2,9% (107). Für Eberakrosin ist bereits die N-terminale Aminosäurefolge von 52 Aminosäuren bekannt (129). Die N-terminale Sequenz Val-Val-Gly-Gly entspricht der charakteristischen Startsequenz der aktivierten Form von Serinproteinasen.

B.3.5. Immunologische Untersuchungen

Bei den immunologischen Untersuchungen konnte keine Kreuzreaktion zwischen Akrosin und Trypsin bzw. Plasmin (112) festgestellt werden (106). Eine Ausnahme bilden die Untersuchungen von Stambaugh und Smith (108); diese Autoren fanden eine immunologische Kreuzreaktion zwischen Trypsin (Rind) und Akrosin (Kaninchen, Bulle). Allerdings führten sie die Immundiffusion bei dem ungewöhnlichen pH-Wert von 5,0 durch, im Unterschied zu den experi-

mentellen Bedingungen, die andere Untersucher wählten (pH 7,3).

Akrosine verschiedener Spezies zeigen z.T. eine immunologische Kreuzreaktion (Lit. s. Morton (106)). Über eine weitergehende immunologische Identität kann aber keine Aussage gemacht werden, da in allen Fällen nur Immundiffusionstests durchgeführt wurden.

B.3.6. Wechselwirkungen mit Amphiphilen

Müller-Esterl et al. (14) stellten fest, daß Akrosin durch nicht-ionische Detergentien aktiviert wird. Triton X-100 bewirkt eine Aktivitätssteigerung bis zu 260%. Andererseits konnte beobachtet werden, daß Akrosin in detergentienfreien Lösungen, insbesondere unter sauren Bedingungen, zur Selbstaggregation neigt (130), wobei Oligomere ($n = 1-7$) auftreten. Enzymatische Aktivität war aber nur bei der monomeren Form vorhanden.

Die Interaktion von Akrosin mit Phospholipiden wurde kürzlich studiert (14). Akrosin wird durch Phospholipide wie Cardiolipin oder Phosphatidylinosit stark gehemmt. Der Schluß liegt nahe, daß Akrosin auch in vivo mit Phospholipiden, d.h. mit biologischen Membranen assoziiert ist, also ein membran-assoziiertes Protein darstellt. Da Akrosin unter recht milden Bedingungen aus Spermien extrahierbar ist, wurde von Hartree und Brown (107) bzw. Müller-Esterl et al. (14) die Hypothese aufgestellt, daß Akrosin ein peripheres Protein der inneren akrosomalen Membran darstellt.

B.3.7. Nachweis von Akrosin im Spermatozoon und Regulation der Enzymaktivität

In neutralen und schwach sauren Extrakten von Spermatozoen kann keine Akrosinaktivität gemessen werden, da gleichzeitig mit dem Enzym Inhibitoren (näheres s. B.3.8.) extrahiert werden, die Akrosin vollständig hemmen. Nach Dissoziation des Enzym-Inhibi-

tor-Komplexes bei pH-Werten $\leq 3,5$ kann jedoch in einem geeigneten Testsystem die "freie" Akrosinaktivität bestimmt werden. Extrahiert man frisch ejakulierte Spermien bei niedrigem pH-Wert in Anwesenheit von Benzamidinen, so wird in den sauren Extrakten nur eine geringe Enzymaktivität gefunden. Nach Dialyse bei pH 8,0 kann eine Enzymaktivierung festgestellt werden. Daraus schlossen Meizel und Mukerji (132,133), Polakoski et al. (134, 135), Schleuning et al. (136) und Brown und Harrison (137), daß Akrosin analog dem Trypsin als Proenzym in den Spermien vorliegt.

Die Akrosinaktivität einzelner Spermatozoen kann mit Hilfe der Gelatinolysetechnik nachgewiesen werden (138). Dazu bringt man Spermien auf eine ca. 10 μm starke Gelatinematrix auf und inkubiert die Probe bei 37°C in einer feuchten Kammer. Während der Inkubation verlieren die Spermienzellen ihre Integrität, das Akrosom zerfällt, Akrosin kann in die Gelatineschicht diffundieren und diese abbauen. Es bilden sich kreisförmige Verdauungshöfe, sog. Halos, in deren Zentren ein Spermienkopf liegt. Eine Korrelation zwischen der Größe der Halos und der enzymatisch messbaren Akrosinaktivität der Spermien wurde gefunden.

An Hand der Aktivitätsmessungen kann der Akrosingehalt pro Spermatozoon berechnet werden. Von Brown und Hartree (139) wird für Widderspermatozoen ein Wert von 3×10^{-18} Mol Akrosin pro Spermatozoon angegeben; für Eberspermien liegt der Wert bei 1×10^{-18} Mol/Spermatozoon. Berücksichtigt man das Volumen eines Akrosoms, so berechnet sich eine erstaunlich hohe intra-akrosomale Akrosinkonzentration von ca. 2 mM (139). Bei derart extrem hohen lokalen Proteinase-Konzentrationen ist eine exzessive Autoproteolyse auch bei einem intra-akrosomalen pH-Wert von 5,0 zu erwarten, sofern nicht effektive Inaktivierungsmechanismen für Akrosin existieren. Drei Hypothesen für die Regulation der akrosomalen Akrosinaktivität werden derzeit diskutiert:

1. Die Proenzym-Enzym-Aktivierung, 2. Die Enzym-Inhibitor-Komplexbildung, 3. Die Enzym-Phospholipid-Interaktion.

Zu 1.: Analog zum Trypsin soll Akrosin in der Speicherform im

Spermatozoon als Proenzym vorliegen. Die Aktivierung erfolgt dann durch limitierte Proteolyse (134,136,137). Meizel et al. (132,133) fanden in der Tat in epididymalen Spermien vom Kaninchen und Hamster nur inaktives Akrosin. In ejakulierten Spermatozoen sind dann geringe Mengen an aktivem Akrosin nachweisbar. Durch Zusatz von Inhibitoren konnte die Aktivierung unterdrückt und inaktives Proakrosin isoliert werden. Aus testikularen Kaninchenspermien konnten Mukerji und Meizel (109) so ein Proakrosin mit einem M.G. von 68 000 isolieren. SDS-Elektrophoresen zeigten, daß das Proakrosin aus zwei Ketten mit jeweils M.G. 34 000 besteht (aktives Kaninchen-Akrosin hat ebenfalls ein M.G. von 34 000). In menschlichen Spermatozoen fanden Tobias und Schumacher zwei Formen eines Proakrosins mit einem M.G. von 75 000 und 42 000 (mittels Gelchromatographie bestimmt (154)). Polakoski et al. (134) fanden zwei Formen von Eber-Proakrosin mit M.G. 55 000 und 53 000. Die Aktivierung dieser Proenzyme folgt bei pH 6,0 - 9,0 einer sigmoidalen Aktivitäts-Zeit-Kurve, wie sie für eine Autoaktivierung typisch ist. Die Umwandlung von Proakrosin zu Akrosin wird in Gegenwart von synthetischen Phospholipidvesikeln um den Faktor 100 beschleunigt (140).

Wann findet nun die Proakrosinaktivierung statt? Brown und Harrison (137) stellten fest, daß Akrosin in intakten Spermien als Proakrosin vorliegt; nach Zerstörung der äußeren akrosomalen Membranen kann hingegen freies Akrosin nachgewiesen werden. Die Autoren postulieren daher, daß die Aktivierung in vivo während der Akrosomenreaktion stattfindet.

Zu 2.: Brown und Harrison (137) gehen davon aus, daß ein Inhibitor, der im Akrosom lokalisiert ist (141), die Aktivierung regulieren kann. Der Inhibitor hemmt die Aktivierung von Proakrosin in intakten Spermien. Wird das Akrosom zerstört, so wird ein Teil des Inhibitors an das umgebende Medium abgegeben und dadurch die effektive Konzentration für eine Hemmung zu gering. Brown und Harrison stellten weiterhin fest, daß Membran-

assoziiertes Akrosin durch synthetische Inhibitoren schwächer gehemmt wird als solubilisiertes Akrosin (142).

Zu 3.: Im Gegensatz zu Trypsin besitzt Akrosin hydrophobe Bindungsstellen für Amphiphile. Die enzymatische Aktivität wird durch die Bindung von Phospholipiden gehemmt (s. B.3.6.). Es ist deshalb denkbar, daß Akrosin durch Bindung an die innere akrosomale Membran inhibiert und durch Ablösen von der Membran aktiviert wird.

B.3.8. Akrosininhibitoren

Natürliche Antagonisten des Akrosins sind die Akrosininhibitoren aus Seminalplasma. Rasmussen und Albrechtsen (145) berichten als erste über die Hemmung von Pankreas-Trypsin durch menschliches Seminalplasma. Später wurde gefunden, daß diese Proteine mit Trypsin-hemmender Wirkung nicht nur im Seminalplasma auftreten, sondern auch in vielen Geweben und Sekreten des männlichen und weiblichen Genitaltraktes. Es handelt sich hierbei um niedermolekulare, säurestabile Proteinaseinhibitoren. Vorkommen, Hemmspezifität und Molekulargewichte dieser Inhibitoren wurden beschrieben (146).

Aus menschlichem Seminalplasma wurden zwei Inhibitoren isoliert, ein Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor (HUSI I) und ein Trypsin-Akrosin-Inhibitor (HUSI II) (146). Akrosininhibitoren finden sich auch in testikularem und epididymalem Gewebe (147). Versuche zur Lokalisation der Inhibitoren in Geweben und Spermien vom Eber mit Inhibitor-spezifischen Antikörpern ergaben, daß die Inhibitoren zwar an ejakulierte Spermien gebunden sind, nicht jedoch an epididymale (146). Damit konnte gezeigt werden, daß sich die Inhibitoren erst während der Ejakulation an die Spermien heften.

Akrosininhibitoren die im Spermium sowie im Seminalplasma vorhanden sind, müssen bei der Isolierung des Akrosins abgetrennt werden. Die Separierung der Seminalplasma-Inhibitoren von den

Spermien erfolgt durch Zentrifugation. Die an die Spermien angelagerten Inhibitoren können erst nach Extraktion der Spermien abgetrennt werden. Dies gelingt nur in saurem Milieu, da die Inhibitoren im neutralen bzw. alkalischen Bereich stabile Komplexe mit Akrosin bilden.

Die biologische Bedeutung der Inhibitoren dürfte in der raschen Inaktivierung von Akrosin liegen, wenn dessen proteolytische Aktivität zu einem für den Organismus ungünstigen Zeitpunkt oder am "falschen" Ort frei wird. Während der Migration der Spermien durch den weiblichen Genitaltrakt werden die Inhibitoren im Rahmen der Kapazitation von Spermien abgetrennt (146). Ohne die Ablösung der Inhibitoren kann eine Befruchtung nicht stattfinden.

Diese Beobachtung dient als Grundlage für das Konzept der anti-enzymatischen Kontrazeption. Ein in vitro Testsystem für geeignete Inhibitoren, die den Spermien post ejaculationem zugesetzt werden, ist der Gelatinolyse-Test (s. B.3.7.). Dazu werden die Inhibitoren mit den Spermien in vitro vorinkubiert und dann auf einen Gelatinefilm aufgebracht. Tritt eine Akrosinhemmung ein, so wird kein Verdauungshalo gebildet (148). Voraussetzung dafür ist, daß der Inhibitor durch die Plasma- und äußere akrosomale Membran diffundieren kann, um die Hemmung des Akrosins im Akrosom zu bewirken, Gegenwärtig sind allerdings nur zwei wirksame Inhibitoren bei menschlichen Spermatozoen bekannt, nämlich Aprotinin und NPGB (148).

Während Aprotinin, ein sehr basisches Protein, vermutlich durch unspezifische Adsorption an die Plasmamembran wirkt, durchdringt NPGB die Membranen und hemmt Akrosin irreversibel durch kovalente Bindung an den Serin-Rest des aktiven Zentrums von Akrosin. NPGB ist jedoch für eine pharmakologische Anwendung zu toxisch, da während der Reaktion mit Akrosin p-Nitrophenol freigesetzt wird.

B.3.9. Aufgabenstellung

Der Spermienproteinase Akrosin scheint eine Schlüsselfunktion bei der Fusion der Gameten (Spermatozoon und Oocyte) bzw. der Akrosomenreaktion zuzukommen. Eine Voraussetzung für die detaillierte Untersuchung des Aktivierungs- und Wirkungsmechanismus von Akrosin ist die Isolierung und Charakterisierung von Akrosin aus ejakulierten Spermatozoen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Reindarstellung von Akrosin und von Akrosin-Vorstufen aus menschlichen Spermatozoen sowie die eingehende Analyse der gewonnenen Enzympräparationen mittels biochemischer und physiko-chemischer Methoden.

C. ERGEBNISSE

C.1. Vorversuche zur Isolierung

C.1.1. Saure Extraktion und Abtrennung der Inhibitoren mit Hilfe der Gelchromatographie

Zunächst wurde versucht, Humanakrosin nach dem für Eberakrosin ausgearbeiteten Reinigungsschema (4) zu isolieren. Es wurde Humansperma verwendet, das über einen Zeitraum von 4 Jahren gesammelt und bei -30°C gelagert worden war (s. D.3.2.1.). Die Extraktion der Spermien erfolgte mit 2% Essigsäure, 50 mM NaCl, 3 mM NaN_3 , pH 2,6. Nach Konzentrierung des sauren Extraktes durch Ultrafiltration (PM-10 Membran) erfolgte eine Gelfiltration an Sephadex G-100. Die Ausbeute bei diesem Schritt lag unter 5%; Zusatz von Detergentien bzw. Benzamidin brachte nur geringe Ausbeutesteigerungen.

Wurden frische Spermien bei pH 2,6 mit 2% Essigsäure, 50 mM NaCl, 3 mM NaN_3 extrahiert und dann ohne Konzentrierung über Sephadex G-100 gegeben, so betrug die Ausbeute ca. 30%. Wurde dagegen über G-75 chromatographiert und auf die NaN_3 -Zugabe zum Elutionspuffer verzichtet (analog den Arbeiten von Schleuning et al. (112)), so erhöhte sich die Ausbeute auf ca. 80%. Auf die gleiche Weise versuchte ich die gelagerten Spermien aufzuarbeiten, d.h. saure Extraktion bei pH 2,6 ohne NaN_3 -Zusatz und anschließende Chromatographie über Sephadex G-75. Dabei konnten jedoch nur ca. 20% des Akrosins von der Säule eluiert werden.

Stabilitätsversuche mit Rohextrakten zeigten dann, daß die Akrosinaktivität bei pH 2,6 sehr rasch abnimmt (Abb.5). Ein Aktivi-

tätsverlust von 50% wurde bereits innerhalb von 9 Stunden beobachtet. Die geringen Aktivitätsausbeuten bei der Gelfiltration bei pH 2,6 dürften deshalb vor allem auf die Säureempfindlichkeit des Akrosins zurückzuführen sein. Aus diesem Grunde wurde die saure Extraktionsmethode aufgegeben und ein geeigneterer pH-Bereich für Extraktion und Chromatographie gesucht.

C.1.2. Extraktion bei pH 5,5 mit 0,1% Triton X-100 und Chromatographie über CM-Sephadex C-50

Extrahiert man gelagerte Spermien bei pH 5,5 mit 0,1 M NaAc, 0,1 M NaCl, 3 mM NaN_3 in Gegenwart von 0,1% (w/v) Triton X-100, so ist die Akrosinaktivität im erhaltenen Rohextrakt über Tage stabil (Abb.5). Die Enzymaktivität wurde in diesen Fällen nach kurzer Vorinkubation bei pH 2,6 bestimmt (s. D.3.1.1.).

Zunächst wurde der Rohextrakt nach Zentrifugation über eine CM-Sephadex C-50-Säule chromatographiert (Abb.6). Zu den Elutionsdiagrammen ist zu bemerken, daß die Absorption bei 280 nm nicht wie üblich bestimmt werden konnte, da Triton X-100 bei 280 nm selbst stark absorbiert.

Akrosin bzw. der Akrosin-Inhibitor-Komplex wurden vom Kationenaustauscher vollständig gebunden. Ein Teil des freien Inhibitors bzw. Inhibitorgemisches wurde an CM-Sephadex C-50 nicht gebunden und im Eluat des Durchbruchvolumens gefunden. Durch Elution mittels eines Salzgradienten (0,1 M NaCl - 0,7 M NaCl in 0,1 M NaAc, 3 mM NaN_3 , 0,1% Triton X-100, pH 5,5) konnten Akrosin und die Akrosin-Inhibitor-Komplexe vom Ionenaustauscher abgelöst werden. Nach dem Ansäuern aliquoter Teile der einzelnen Fraktionen auf pH 2,6 zur Dissoziation des Akrosin-Inhibitor-Komplexes wurde festgestellt, daß der Komplex annähernd bei der gleichen Ionenstärke wie freies Akrosin eluiert wird, der freie Inhibitor dagegen schon bei geringerer Ionenstärke (Abb.6). Die Ausbeute an freiem Akrosin betrug ca. 30%. Nach Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes wurden jedoch 86% der Ausgangsaktivität wieder gefunden.

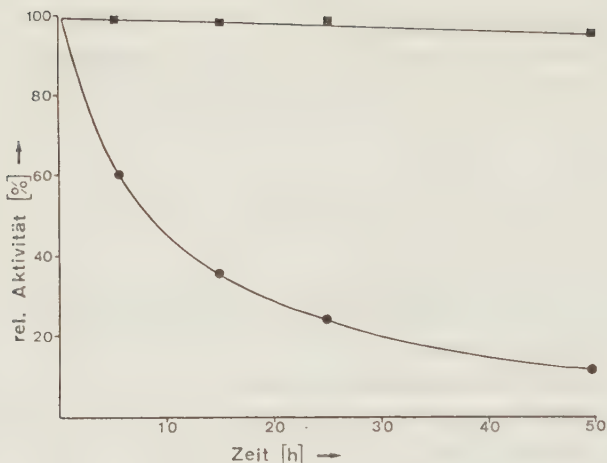


Abb.5 Stabilität der Akrosinaktivität in den Rohextrakten bei verschiedenen pH-Werten

●—● pH 2,6 ■—■ pH 5,5

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch Chromatographie an CM-Sephadex C-50 bei pH 5,5 der Inhibitor nur zu einem geringen Teil vom Akrosin abgetrennt wird. Optimal wären hingegen Bedingungen, bei denen der Inhibitor quantitativ separiert würde. Bei Erniedrigung des pH-Wertes ist das Gleichgewicht zwar zugunsten der dissoziierten Komplexpartner verschoben, andererseits nimmt aber die Stabilität von Akrosin bei einem pH-Wert von 2,6 rapide ab. Es wurde daher versucht, durch Chromatographie bei pH 3,6 beiden Anforderungen einer erhöhten Komplex-Dissoziation und tolerierbaren Akrosin-Stabilität gerecht zu werden.

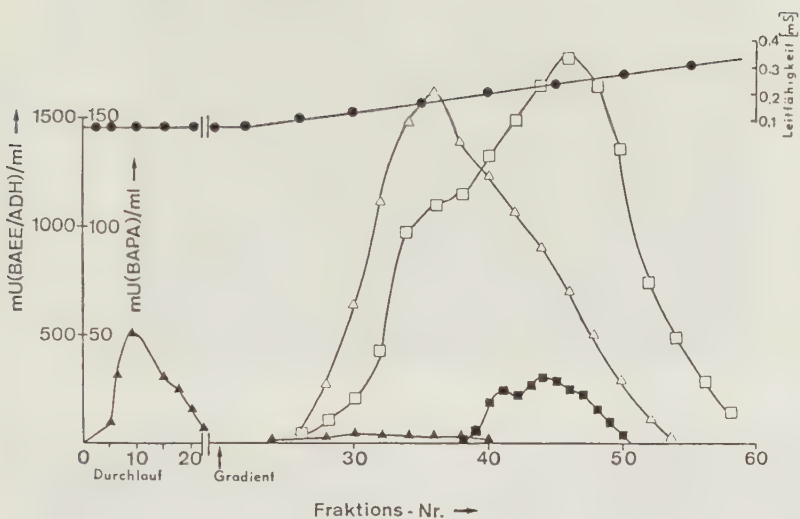


Abb.6 Chromatographie des Rohextraktes an CM-Sephadex C-50

Angegeben ist die Inhibitoraktivität bei pH 5,5 (▲-▲), pH 2,6 (nach Vorinkubation) (Δ-Δ), die Akrosinaktivität bei pH 5,5 (■-■), pH 2,6 (nach Vorinkubation) (□-□) und die Leitfähigkeit (●-●) des Elutionspuffers.

C.2. Isolierung von Akrosin aus Humanspermatozoen

C.2.1. Sammlung und Extraktion der Spermien

Die Spermien stammten teilweise von einem andrologischen Patientenkollektiv (Sperma A) und zum anderen Teil von gesunden Spendern (Sperma B), (näheres s. D.3.2.1.). Zur Überprüfung der Integrität der verwendeten Spermien, die z.T. über mehrere

Jahre gelagert worden waren, wurde der Gelatinolyse-Test (s. B.3.7.) (149) durchgeführt. Dabei zeigte sich (Abb.7), daß die Spermien der Gruppe A keine gelatinolytische Aktivität mehr aufwiesen und die Spermien der Gruppe B nur noch zu einem sehr geringen Prozentsatz zu einer viel geringeren Halobildung befähigt waren. Zum Vergleich sind in Abb.7 auch die Verdauungshöfe frisch ejakulierter Spermatozoen abgebildet. Man muß folglich davon ausgehen, daß ein Großteil der Spermien bereits morphologische und evt. auch biochemische Modifikationen im Verlaufe der Lagerung erfahren haben muß. Aufgrund der begrenzten Möglichkeiten, neues Material zu gewinnen, mußte der Großteil der Versuche mit gelagerten Spermien durchgeführt werden.

Für die Isolierung des Akrosins wurden die Spermien bei pH 5,5 unter Zusatz von 0,1% (w/v) Triton X-100 zweimal extrahiert und der Extrakt bei 20 000 U/Min. abzentrifugiert. Im Durchschnitt wurden von 6 ml Zellsediment 300 - 380 U (BzArgOEt/ADH) Akrosin erhalten. Berechnet man die Menge an Akrosin, die pro Ejakulat erhalten wurde, so kommt man auf ca. 2 µg - 4 µg extrahierbares Akrosin pro Ejakulat (entspricht ~240 mU (BzArgOEt/ADH)).

C.2.2. Chromatographie an SP-Sephadex C-50

Zur Abtrennung der Akrosininhibitoren wurde der Überstand aus der Zentrifugation auf pH 3,6 eingestellt und an SP-Sephadex C-50 chromatographiert (s. D.3.2.2. und Abb.8). Akrosin und die Inhibitoren wurden bei einer Ionenstärke von 0,15 M NaCl quantitativ gebunden. Zur Elution wurde ein linearer Salzgradient von 0,15 - 0,8 M NaCl in 0,1 M NaAc, 3 mM NaN_3 , 0,1% (w/v) Triton X-100, pH 3,6 verwendet. Die Inhibitoren wurden im Bereich von 0,31 - 0,45 M NaCl und Akrosin im Bereich von 0,45 - 0,58 M NaCl eluiert. Die Abtrennung der Inhibitoren vom Akrosin gelang unter diesen Versuchsbedingungen quantitativ. Eine pH-Änderung auf pH 5,5 führte bei den vereinigten Akrosinfraktionen zu keiner Aktivitätsminderung mehr. Die Ausbeute an aktivem Enzym betrug zwischen 65 und 78%.

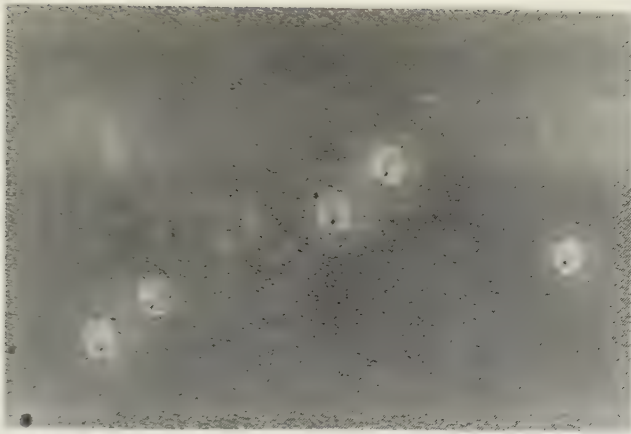


Abb. 7a



Abb. 7b



Abb. 7c

Abb. 7 Gelatinolyse-Test von Humanspermatozoen

- a frisch ejakulierte Spermien
- b Spermien der Gruppe B
- c Spermien der Gruppe A

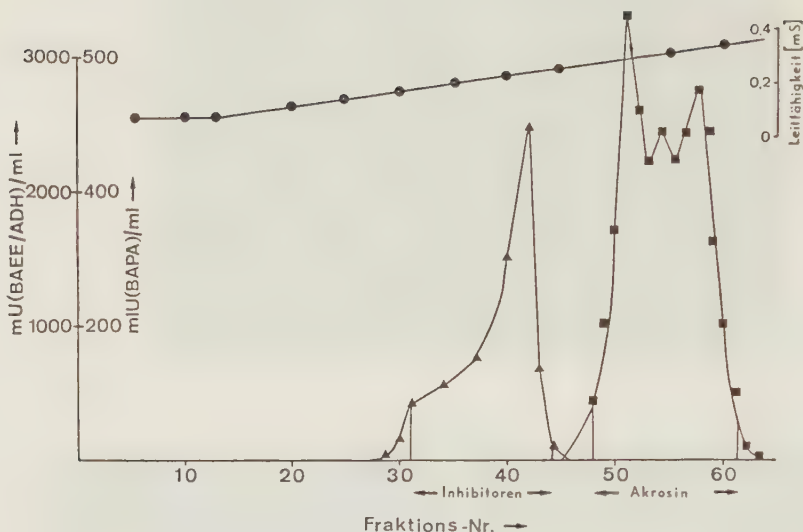


Abb.8 Chromatographie an SP-Sephadex C-50 (s. D.3.2.2.)

Angegeben ist die Inhibitoraktivität ($\blacktriangle$ — $\blacktriangle$), die Akrosinaktivität ($\blacksquare$ — $\blacksquare$) und die Leitfähigkeit ($\bullet$ — $\bullet$).

C.2.3. Chromatographie an p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose

Als weiterer Reinigungsschritt folgte die Affinitätschromatographie an p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose (s. D.3.2.3.). Zur Bindung von Akrosin an den immobilisierten Inhibitor wurde der pH-Wert des Ionenaustauscher-Eluates auf pH 6,0 eingestellt. Für diese Bindung wurde ein möglichst niedriger pH-Wert gewählt, um autoproteolytische Spaltungen so weit wie möglich zu unterbinden. Bei dem angegebenen pH-Wert erfolgte eine quantitative Bindung des Enzyms an die Gelmatrix. Abgelöst wurde

Akrosin bei pH 3,0. In die Vorlagen wurde Puffer vom pH 5,5 vorgegeben, so daß Akrosin nur kurze Zeit einem sauren Milieu ausgesetzt war. Die Ausbeute bei diesem Reinigungsschritt lag zwischen 70 und 80%.

Die Affinitätschromatographie stellt den spezifischsten Schritt der Isolierungsprozedur dar mit einem Reinigungsfaktor von 188; sie ist daher unverzichtbar bei der Reinigung des Humanakrosins.

Abb.9 zeigt Elektrophoresemuster in Polyacrylamidgelen, angefertigt nach D.3.3.1.1. Abb.9a zeigt die zymographische Färbung nach den einzelnen Aufarbeitungsschritten. Abb.9b zeigt das Elektrophoresemuster einer typischen Akrosinpräparation nach der Affinitätschromatographie mit Protein- und zymographischer Färbung.

Das erhaltene Produkt stellt eine Mischung multipler Akrosinformen dar, nämlich von Akrosin b,c und d (in der Reihenfolge zunehmender elektrophoretischer Mobilität) bzw. von Akrosin c und d. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Banden ist u. a. abhängig von der Zeitdauer, in welcher die Isolierung durchgeführt wurde.

C.2.4. Trennung multipler Formen durch präparative Polyacrylamidgel-Elektrophorese

C.2.4.1. Ausarbeitung der optimalen Elektrophorese- und Extraktionsbedingungen

Akrosin c und d liegen in der Disk-Elektrophorese (Gelsystem Maurer Nr.8, s. D.3.3.1.1.) relativ nahe beeinander. Um eine optimale Trennung zu erzielen, wurden die Elektrophoresebedingungen modifiziert, z.B. durch Variation der Gelkonzentration (7,5 oder 10%), durch Zusatz von 0,25% (w/v) Triton X-100 oder durch Veränderung des pH-Wertes im Trenngel. Gelsysteme mit einem pH von 5,0 bzw. 4,0 im Sammelgel und 3,8 bzw. 2,3 im Trenngel wurden verwendet. Änderungen der Gelkonzentration brachten

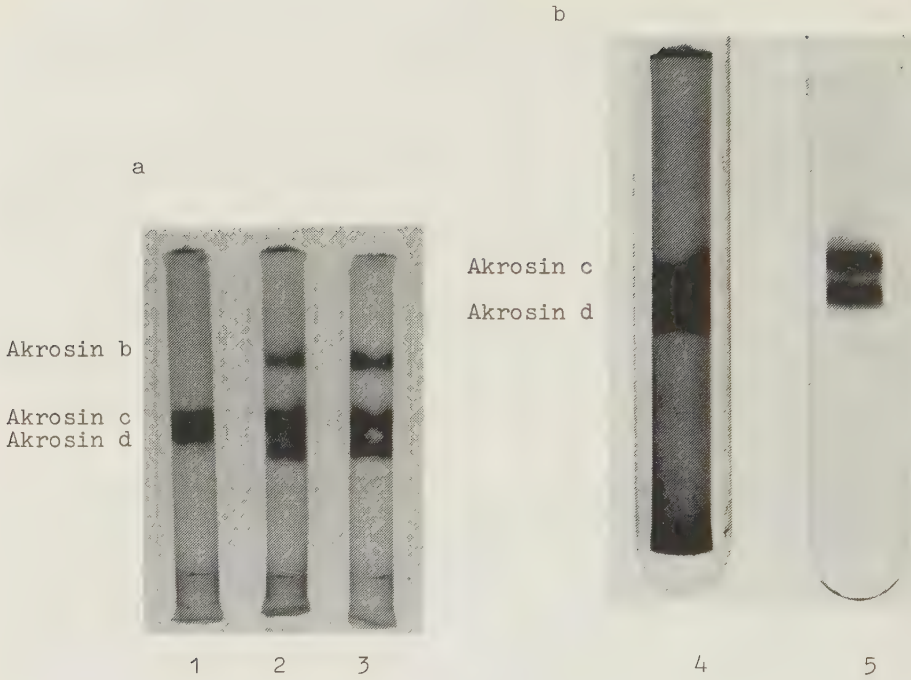


Abb.9 Disk-Elektrophoresen der Akrosinpräparationen
(s. D.3.3.1.1.)

- a zymographische Färbung
 - 1 Rohextrakt
 - 2 nach SP-Sephadex C-50-Chromatographie
 - 3 nach Affinitätschromatographie
- b nach der Affinitätschromatographie
 - 4 zymographische Färbung
 - 5 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250

keine Verbesserung der Auftrennung. Bei pH 2,3 wurden die Banden zwar besser getrennt, das Akrosin war jedoch nicht mehr enzymatisch aktiv bei der Aktivitätsfärbung mit Bz-Arg-NHNaph und Fast Garnet GBC-Salz.

Bei der Trennung von Histonen aus Drosophila-Embryos wurden bessere Trennungen der Histon-Subklassen erreicht, wenn Harnstoff zum Polyacrylamidgel zugegeben wurde. In Abb.10 sind Disk-Elektrophoresen in Gegenwart von 2, 4 und 6 M Harnstoff sowie 0,25% (w/v) Triton X-100 dargestellt. Insbesondere bei der enzymatischen Färbung ist zu beobachten, daß bei Zusatz von 4 und 6 M Harnstoff die Banden schärfer werden, Akrosin aber eine geringere Mobilität aufweist. Bei verlängerter Elektrophoresedauer werden die Banden nicht weiter separiert.

Unter sämtlichen erprobten Systemen wurde die beste Trennung von Akrosin c und d in einem 7,5% Polyacrylamidgel nach Maurer (6, Gel Nr.8) in Gegenwart von 0,25% (w/v) Triton X-100 erreicht.

Für die Ausarbeitung optimaler Bedingungen zur Extraktion der Proteine aus dem Gel wurden ebenfalls einige Vorversuche unternommen. In die Taschen eines Polyacrylamid-Flachgels wurden jeweils 1,3 U Akrosin (Eluat von SP-Sephadex C-50) gegeben und nach der elektrophoretischen Auftrennung unter Verwendung verschiedener Puffer sowie Homogenisierungsbedingungen extrahiert (Tab.1). Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß bei zweimaliger Extraktion des Gels mit Triton-haltiger Pufferlösung die besten Ausbeuten (ca. 41 - 43%) erzielt wurden. Die Vorbehandlung des Gels hatte auf die Ausbeute keinen Einfluß. Eine Extraktionsdauer von je 30 Minuten erwies sich als ausreichend.

C.2.4.2. Präparative Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde in einer Flachgelelektrophorese-Apparatur durchgeführt (s. D.3.2.4.). Die Konzentrierung der Akrosinlösung (Eluat der Affinitätschromatographie) erfolgte mittels Ultrafiltration. Die konzentrierten Akrosinlösungen wurden sofort aufgetragen, um größere Verluste durch Autoproteolyse zu

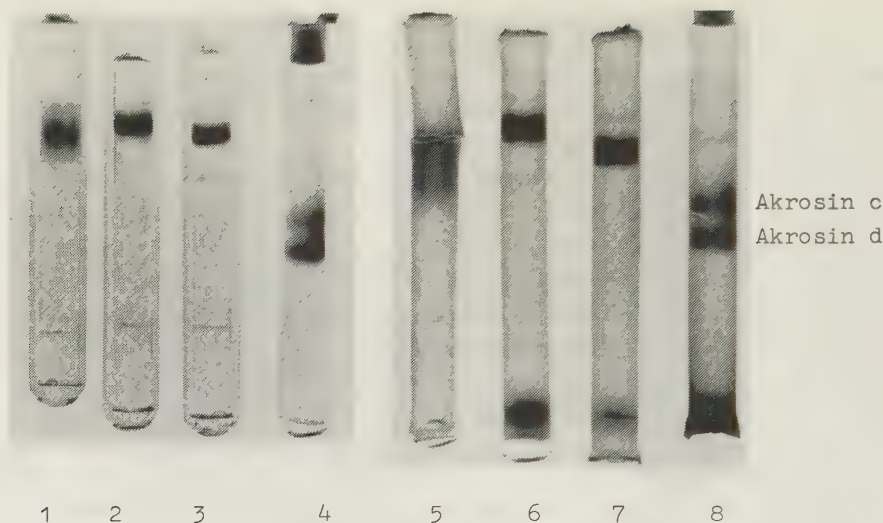


Abb.10 Disk-Elektrophoresen von Akrosin bei Zusatz von Harnstoff (s. D.3.3.1.1.)

1 - 4	Proteinfärbung
5 - 8	zymographische Färbung
1 und 5	2 M Harnstoff
2 und 6	4 M Harnstoff
3 und 7	6 M Harnstoff
4 und 8	ohne Harnstoff

vermeiden. Nach erfolgter Elektrophorese erwies sich die Anfärbung der Akrosin-Banden mit Hilfe der enzymatischen Färbung als besonders geeignet. Zweimaliges Eluieren mit Triton-haltiger Pufferlösung führte zu Ausbeuten für Akrosin b zwischen 5 und 12%, für Akrosin c von 30 - 44% und für Akrosin d von 8 - 16% (jeweils bezogen auf das Ausgangsgemisch der drei Formen). Die Gesamtausbeute an allen multiplen Formen lag bei ca. 60% der applizierten Aktivität. Die prozentuale Verteilung der

Tabelle 1 Extraktion von Akrosin c aus Polyacrylamidgel

Extraktionsart	1.Extraktion %	2.Extraktion %	3.Extraktion %	1.+2.+3. Extraktion %
I. Wasser, 1/2 h	12	8	3	23
II. Wasser, 3 h	13	8	3	24
III. Puffer ^a , 1/2 h	30	11	2	43
IV. Puffer, 3 h	28	10	3	41
V. Wasser, 1/2 h	14	9	2	25
VI. Wasser, 3 h	13	10	1	24
VII. Puffer ^a , 1/2 h	27	9	3	39
VIII. Puffer, 3 h	28	9	3	41

I. - IV.: Gel mechanisch zerstoßen, extrahiert
V. - VIII.: Gel bei -196°C einfrieren, mechanisch zerstoßen, extrahiert
^a0,1 M NaAc, 0,1 M NaCl, 0,1% (w/v) Triton X-100, 3 mM NaN₃, pH 5,5

Akrosin-Banden variierte bei den einzelnen Aufarbeitungen je nach Ausgangsmaterial und Dauer der Isolierung erheblich.

C.2.4.3. Entsalzung und Entfernung von Detergentien

Die Hauptkomponente Akrosin c wurde von jeder Isolierung direkt weiterverarbeitet (s.u.). Akrosin b und d hingegen wurden von mehreren Isolierungen gesammelt und die jeweiligen Pools dann von den Salzen und Detergentien befreit.

Die Entsalzung wurde mit Hilfe der Ultrafiltration in einer Amiconzelle durchgeführt (s. D.3.2.5.). Nach Konzentrierung wurde die Probe zwei- bis dreimal jeweils mit 0,05 M NH_4Ac , 0,1% (w/v) Triton X-100, pH 5,5 aufgefüllt. Das nicht-ionische Detergens Triton X-100 verhinderte weitgehend die Adsorption von Akrosin an die Membranoberfläche. Die Ausbeute bei der Entsalzung betrug ca. 80% (bezogen auf die Aktivität).

Zur Entfernung von Triton X-100 wurde die entsalzte Probe mit Essigsäureäthylester dreimal ausgeschüttelt. Mit Hilfe eines modifizierten Tests zur quantitativen Bestimmung des Detergens (s. D.3.3.5.) wurde der Restgehalt an Triton in der Akrosinlösung zu $\leq 0,005\%$ bestimmt. Die Ausbeute bei der Tritonextraktion betrug ca. 90% (bezogen auf die enzymatische Aktivität). Anschließend wurde das Material lyophilisiert.

Versuche, Salz und Detergentien in einem Schritt durch Gelfiltration an Merckogel-2000 zu entfernen, schlugen fehl, da die Ausbeute an Akrosinaktivität nur 20% betrug. Ein Teil des Akrosins wurde mit dem Salzpeak eluiert (ca. 5%), weitere 20% konnten mit 0,1 M NaAc , 0,1 M NaCl , 3 mM NaN_3 , 0,1% (w/v) Triton X-100, pH 5,5 von der Gelmatrix wieder abgelöst werden. Es bleibt offen, ob die restlichen 55% der Ausgangsaktivität durch Inaktivierung oder Adsorption an die Gelmatrix verloren gingen.

Abb.11 zeigt das Proteinmuster der isolierten Akrosinformen b, c und d nach der Elektrophorese in Polyacrylamidgelen.

R_f
0,33 Akrosin b
0,54 Akrosin c
0,60 Akrosin d

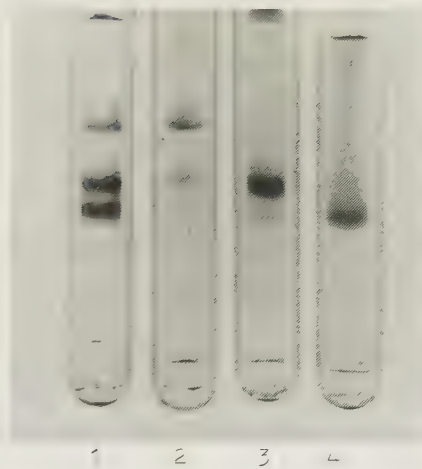


Abb.11 Disk-Elektrophoresen von lyophilisiertem Akrosin mit nachfolgender Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bedingungen s. D.3.3.1.1.)

- | | | |
|---|---|---|
| 1 | Akrosin vor der präparativen Elektrophorese | |
| 2 | Akrosin b | } nach der präparativen
Elektrophorese |
| 3 | Akrosin c | |
| 4 | Akrosin d | |

Tabelle 2 enthält eine Zusammenfassung der Isolierungsprozedur für Humanakrosin mit Angabe von Ausbeuten, spezifischen Aktivitäten und Anreicherungs-faktoren für jeden einzelnen Reinigungsschritt.

Tab.2 Anreicherungsschema zur Isolierung von Akrosin aus Humanspermien

Reinigungsschritt	Vol ^a [ml]	Ges. Prot. [mg]	Prot. konz. [mg/ml]	Ges. Akt. [U]	Spez. Akt. [U/mg]	Akrosin- konz. [mg/ml]	Aus- beute [%]	Aus- beute [%]	Anreich. faktor [n-fach]
Rohextrakt	140	2100	21,8	336	0,16	0,02	-	-	1,0
Rohextrakt pH 3,6	145	2100	21,06	270	0,13	0,015	80,3	80,3	0,81
SP-Sephadex C-50	158	320	2,02	197	0,65	0,010	73,0	58,6	4,1
Benzamidin-Sepharose	12	1,22	0,10	149	122	0,10	76,0	44,3	762
Präparative Elektrophorese									
vor UF	12	1,22	0,10	140		0,10		41,6	
nach UF	0,7			112		1,3	80	33,3	
Akrosin b	11			12,6		0,01	9	4,0	
Akrosin c	12			42,6		0,029	38	12,6	
Akrosin d	11			14,5		0,01	13	4,3	
Entsalzung von Akrosin c	2			33,2		0,14	78	9,8	
Detergentienabtren- nung (Akrosin c)	2	0,36	0,09	29,8	82	0,18 ^f	90	8,9	512

^aExtraktions- oder Elutionsvolumen

^bBz-Arg-OEt/ADH-Testsystem 25°C

^cbezogen auf eine spez.Aktivität von 122 U/mg

^dbezogen auf jeden Reinigungsschritt

^ebezogen auf die Ausgangsmenge

^fberechnet auf eine spez.Aktivität von 82 U/mg

C.3. Versuche zur chromatographischen Trennung multipler Akrosin-Formen

C.3.1. Elution mittels eines pH-Gradienten von p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose

Mit Hilfe eines pH-Gradienten wurde versucht, die multiplen Formen affinitätschromatographisch zu trennen. Schleuning et al. (112) konnten durch selektive Ablösung bei pH 5,5 Akrosin d von b und c separieren, die bei pH 3,0 eluiert wurden. Die Affinitätssäule wurde mit dem Akrosin-haltigen Eluat des Ionenaustauschers beladen, das Akrosin b, c und d enthielt (s. D.3.2.6.1.). Das beim Anlegen eines pH-Gradienten resultierende Elutionsprofil ist in Abb.12 dargestellt. Das Maximum der Akrosinaktivität wurde bei pH 3,2 eluiert. Insgesamt wurden drei Fraktionen getrennt gesammelt. Fraktion I enthielt 8,5 U (5,5%), Fraktion II 16,6 U (10,8%) und Fraktion III 104,9 U (68%); die Gesamtausbeute an Akrosinaktivität lag bei 84,3%. Die elektrophoretische Untersuchung zeigte, daß in allen drei Fraktionen die Akrosine b, c und d nebeneinander vorlagen. Eine Trennung der drei Akrosinformen mittels eines pH-Gradienten ist demnach nicht möglich.

C.3.2. Rechromatographie an SP-Sephadex C-50

Bei der Chromatographie an SP-Sephadex C-50 wurde Humanakrosin in einer breiten Hauptfraktion eluiert, die offensichtlich mehrere Nebenfraktionen umfaßte. Daraufhin wurde gereinigtes Akrosin (Akrosin c und d von der Affinitätschromatographie) mit Hilfe eines flachen Gradienten an SP-Sephadex C-50 rechromatographiert (s. D.3.2.6.2.).

Das Elutionsprofil ist in Abb.13 dargestellt. Akrosin wurde als symmetrischer Peak bei einer Ionenstärke von 0,51 M NaCl in 0,1

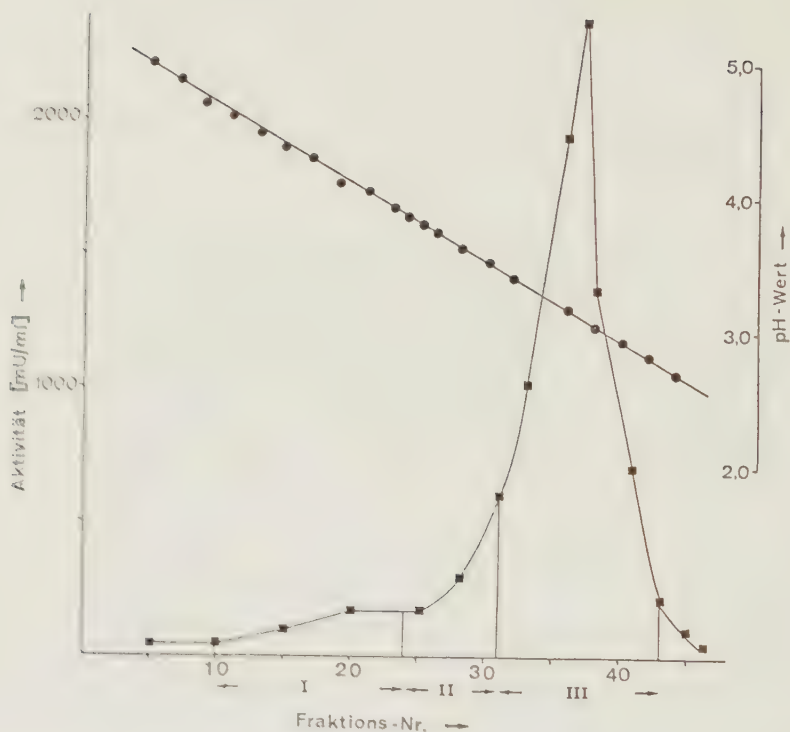


Abb.12 pH-Gradienten-Elution zur Ablösung von Akrosin von p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose (s. D.3.2.6.1.)

Angegeben ist die Akrosinaktivität (■—■) und der pH-Wert des Elutionspuffers (●—●).

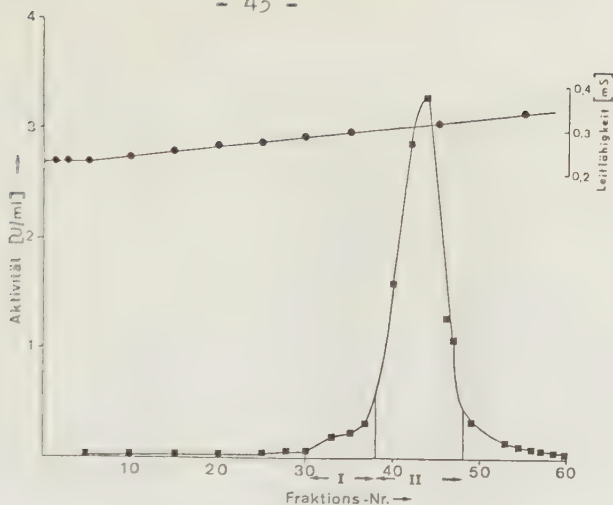
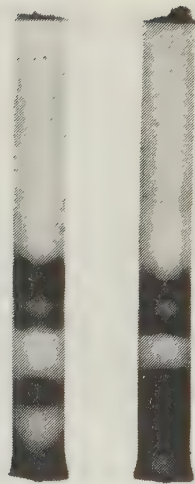


Abb. 13 Rechromatographie an SP-Sephadex C-50
(s. D.3.2.6.2.)

Angegeben ist die Akrosinaktivität (■—■)
und die Leitfähigkeit des Elutionspuffers
(●—●).

M NaAc, 0,1% (w/v) Triton X-100, 3 mM NaN_3 , pH 3,6, eluiert. Die Ausbeute an Akrosinaktivität betrug 47%. Die enzymatische Färbung der Disk-Elektrophoresen läßt erkennen, daß sich die prozentuale Verteilung der zwei Formen geändert hat (Abb. 14). Während das Ausgangsmaterial ein Verhältnis Akrosin c : d von etwa 1 : 1 aufwies, zeigte Fraktion II des rechromatographierten Produktes ein Akrosin c : d Verhältnis von etwa 3 : 1.

Für eine quantitative Trennung von Akrosin c und d ist die Ionenaustauschchromatographie jedoch nicht geeignet, da stets beide Formen c und d in wechselndem Verhältnis nebeneinander vorlagen. Außerdem war die Totalausbeute an Akrosinaktivität von 47% relativ niedrig.



Akrosin c
Akrosin d
Marker

1

2

Abb.14 Disk-Elektrophoresen (s. D.3.3.1.1.)
der Akrosinformen nach SP-Sephadex
C-50 Rechromatographie und zymogra-
phischer Färbung

- 1 Fraktion II (s. Abb.13)
- 2 Ausgangsmaterial

C.3.3. Chromatographie an CM-Sepharose CL-6B

Die Chromatographie an CM-Sepharose wurde bei pH 5,5 durchge-
führt, um die Ausbeute gegenüber der Rechromatographie an SP-
Sephadex C-50 bei pH 3,6 zu verbessern. CM-Sepharose CL-6B
besitzt außerdem bessere Laufeigenschaften als die entspre-

chenden Sephadex-Gele, so daß mit höheren Fließgeschwindigkeiten gearbeitet werden kann.

Als Ausgangsprodukt wurde eine Präparation von Akrosin mit einem Formenverhältnis $b : c : d$ von ca. $1 : 2 : 2$ verwendet (s. D.3.2.6.3.).

In Abb.15 ist das Elutionsprofil der Chromatographie dargestellt. Die Ausbeute betrug für die Fraktionen I 5%, II 15% und III 37%, entsprechend einer Gesamtausbeute von 57%. Bei der elektrophoretischen Untersuchung der Fraktionen I, II und III konnte keine Auftrennung in die verschiedenen multiplen Formen festgestellt werden, obgleich das Elutionsmuster (Hauptpeak mit Schulter) eine partielle Separation nahelegte.

C.3.4. Chromatographie an Sephadex G-75

Die Chromatographie an Sephadex G-75 wurde bei pH 5,5 in Gegenwart von 0,1% (w/v) Triton X-100 durchgeführt, da Akrosin unter diesen Bedingungen relativ stabil ist. Als Ausgangsprodukt wurde ein affinitätschromatographisch gereinigtes Akrosin mit einem Formenverhältnis $b : c : d$ von ca. $1 : 2 : 2$ verwendet (s. D. 3.2.6.4.).

Das zugehörige Elutionsdiagramm ist in Abb.16 dargestellt. Fraktion I umfaßte 43,8% und Fraktion II 27% der Ausgangsaktivität. Die Gesamtausbeute errechnet sich somit zu 70,8%. Die Molekulargewichte für Peak I wurden zu $45\,000 \pm 3\,000$ und für Peak II (Schulter) zu $40\,000 \pm 3\,000$ bestimmt. Die elektrophoretische Untersuchung der beiden Fraktionen zeigte eine partielle Auftrennung von Akrosin c (Fraktion I) und Akrosin d (Fraktion II), jedoch konnte in beiden Fällen kein Akrosin b mehr nachgewiesen werden.

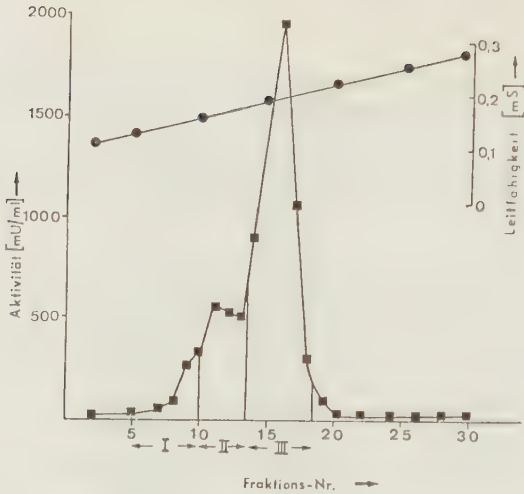


Abb.15 Chromatographie an CM-Sepharose CL-6B (s. D.3.2.6.3.)

Dargestellt ist die Akrosinaktivität (■—■) und die Leitfähigkeit (●—●) in den eluierten Fraktionen.

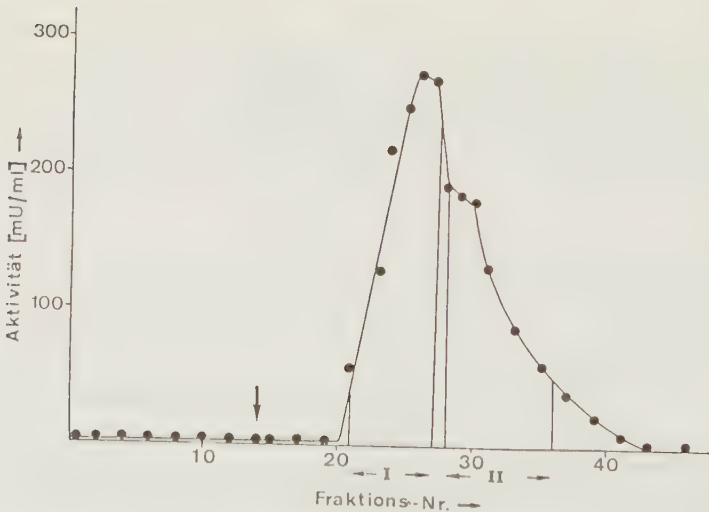


Abb.16 Chromatographie an Sephadex G-75 (s. D.3.2.6.4.)
Dargestellt ist die Akrosinaktivität (●—●).

C.4. Reinheitsprüfungen und Charakterisierung

C.4.1. Proteingehalt und spezifische Aktivität

Für die Bestimmung des Proteingehaltes wurde ein modifizierter Lowry-Test (13) benutzt, der eine Quantifizierung auch in Anwesenheit von 0,1% Triton X-100 erlaubt. Bei der Akrosinisolierung mittels präparativer Elektrophorese wurde der Proteingehalt durch quantitative Aminosäureanalyse bestimmt, da der Lowry-Test durch mitextrahierte Begleitprodukte gestört wurde.

Nach der Affinitätschromatographie lag die spezifische Aktivität bei ca. 120 U/mg Proteingemisch von Akrosin c und d. Nach der präparativen Elektrophorese betrug die spezifische Aktivität von Akrosin ca. 82 U/mg Protein. Die Verminderung der spezifischen Aktivität dürfte auf eine Denaturierung des Akrosins bei der Entsalzung und Entfernung von Triton X-100 zurückzuführen sein.

C.4.2. Elektrophoresen

C.4.2.1. Disk-Elektrophoresen

Die lyophilisierten Akrosinformen b, c und d wurden in der Disk-Elektrophorese analysiert (s. Abb.11). Das Proteinmuster nach Coomassie Brilliant Blue-Färbung zeigt an, daß die multiplen Formen bei der präparativen Elektrophorese weitgehend voneinander abgetrennt wurden. Akrosin b ist noch durch geringe Mengen von Akrosin c kontaminiert; weitere Proteinbanden sind nicht zu erkennen. Akrosin c und d erscheinen als homogene Proteine in der Disk-Elektrophorese.

C.4.2.2. Isoelektrische Fokussierung

Zur isoelektrischen Fokussierung wurde eine Enzympräparation mit einem Akrosinverhältnis c : d von ca. 1 : 1 eingesetzt (s. D.3.3.1.2.). In Abb.17 sind die Gele mit dem zugehörigen pH-Gradienten kombiniert: Gel 1 zeigt die Referenzproteine (Zusammensetzung s. D.3.3.1.2.); bei Gel 2 wurden 50 µg Akrosin (gelöst bei pH 5,0) und bei Gel 3 20 µg (gelöst bei saurem pH-Wert) aufgetragen. Im Gel 2 wurde ein pI von 10,5 für die Hauptbande bestimmt; das Auftreten von Nebenbanden mit $pI < 10,5$ deutet auf Ladungsheterogenitäten in der Akrosinpräparation hin. In Gel 3 wurde eine Proteinbande mit einem pI von 10,2 gefunden. Außerdem war nahe der Auftragsstelle (Anode) eine weitere Proteinbande mit einem pI von 3,0 zu beobachten. Zur Charakterisierung der beiden Proteine (pI 10,5 und 3,0) wurden die Banden aus dem Gel herausgeschnitten und zusätzlich in einer 2. Dimension im SDS-Gradientengel analysiert; dabei ergab sich, daß beide Proteinbanden Akrosin c und d im Verhältnis 1 : 1 enthalten. Offensichtlich kommt die Proteinbande an der Auftragsstelle durch Aggregation von Akrosin zustande; die hochmolekularen Aggregate sind dann nicht mehr in der Lage, in das Gel einzuwandern. Oligomerisation von Akrosin tritt besonders in detergentienfreien und sauren Lösungen auf (130).

C.4.2.3. SDS-Elektrophorese

Nach der vollständigen und raschen Inaktivierung von Akrosin durch DFP (mit Isopropanol als Phasenvermittler) wurde in der SDS-Elektrophorese nach Weber-Osborn bzw. im diskontinuierlichen Gradientengel nach Laemmli (s. D.3.3.1.3.) mit nativem Akrosin c eine Bande vom M.G. $\sim 39\ 000$ erhalten (Abb.18). Die schwache Bande vom M.G. $\sim 34\ 000$ ist auf eine geringe Kontamination mit Akrosin d zurückzuführen. Zum Vergleich wurde Akrosin c auch ohne vorherige Inaktivierung durch DFP elektrophoretisch analysiert; dabei wurde neben den Akrosinbanden c (M.G. $\sim 39\ 000$) und d (M.G. $\sim 34\ 000$) eine ganze Kaskade autoproteolytischer Abbauprodukte

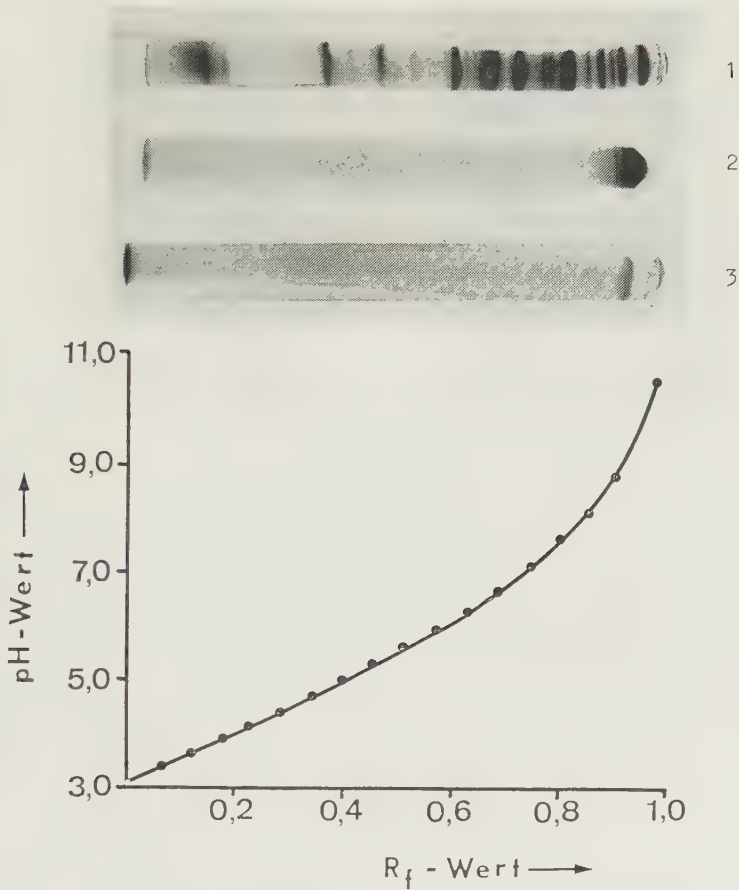


Abb.17 Isoelektrische Fokussierung von Akrosin c und d
nach Coomassie Brilliant Blue R-250 Färbung (s.
D.3.3.1.2.)

1 Standardproteine
2 Humanakrosin (50 μ g, gelöst bei pH 5,0)
3 Humanakrosin (20 μ g, gelöst bei saurem pH-Wert)

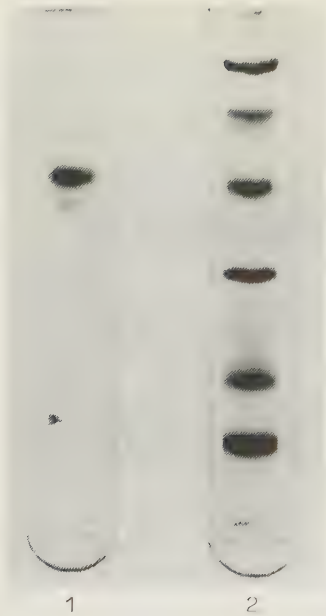


Abb.18a

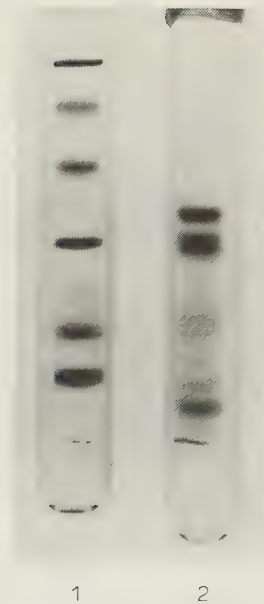


Abb.18b

Abb.18 SDS-Elektrophoresen nach Coomassie Brilliant Blue R-250 Färbung (s. D.3.3.1.3.)

- a 1 Akrosin c: unreduziert, nach DFP-Inaktivierung
2 Markergemisch
- b 1 Markergemisch
2 Akrosin c: unreduziert, ohne vorherige DFP-Inaktivierung

mit M.G. von $\sim 32\,500$, $\sim 22\,000$, $\sim 20\,000$, $\sim 15\,000$ und $\sim 12\,000$ gefunden. Autoproteolyse des nativen Enzyms findet demnach trotz der Anwesenheit von denaturierenden Agentien wie SDS oder Harnstoff statt (107,129,130). In der Disk-Elektrophorese sind die

verschiedenen Abbauprodukte nicht unterscheidbar. In einem Parallelversuch, bei dem Akrosin im SDS-freien Elektrophorese-Probenpuffer vorinkubiert wurde, tritt bei der nachfolgenden Disk-Elektrophorese wiederum nur eine Bande (Akrosin c) auf.

Wird Akrosin (Gemisch von c und d) mit Dithiothreitol in Anwesenheit von SDS reduziert, so treten kleinere Fragmente mit Molekulargewichten von $\sim 20\ 000$, $\sim 16\ 000$, $\sim 14\ 000$ und $\sim 12\ 000$ auf. Daraus läßt sich folgern, daß in Akrosin c und d bereits interne Spaltstellen vorhanden sind (s. Abb. 12c). Für die multiplen Akrosinformen b und d wurden Molekulargewichte von $53\ 000$ bzw. $34\ 000$ unter nicht-reduzierenden Bedingungen ermittelt.

C.4.3. Aminosäurezusammensetzung

In Tabelle 3 ist die Aminosäurezusammensetzung für Akrosin c angegeben (s. D.3.3.3.). Das Molekül besteht aus 343 Aminosäuren ohne Berücksichtigung des Tryptophangehaltes. Cystein wurde nach Perameisensäureoxidation bestimmt. Akrosin c enthält Glukosamin und Galaktosamin; eine quantitative Bestimmung des Zuckeranteils wurde jedoch nicht durchgeführt. Auf der Basis der Aminosäurezusammensetzung berechnet sich ein Molekulargewicht von 36 499 (ohne Tryptophanreste).

C.4.4. Substratspaltung und Bestimmung der K_M -Werte

Die Akrosin-katalysierte Hydrolyse von Ac-Phe-Arg-OEt und Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA (S-2222) wurde eingehender studiert und mit der Spaltung von Bz-Arg-OEt verglichen. Außerdem wurden die K_M -Werte für die Substrate Bz-Arg-OEt, Ac-Phe-Arg-OEt und S-2222 ermittelt.

Ac-Phe-Arg-OEt wurde verwendet, da es gegenüber Kallikrein ein sehr viel empfindlicheres Substrat darstellt als Bz-Arg-OEt

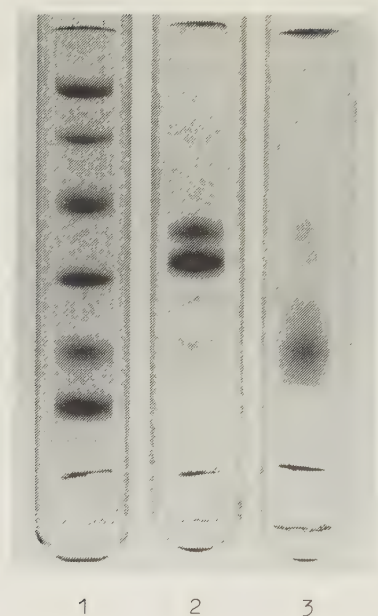


Abb.18c SDS-Elektrophoresen nach
Coomassie Brilliant Blue
R-250-Färbung (s. D.3.3.1.3.)

- 1 Marker Gemisch
- 2 Akrosin c und d im Verhältnis 1 : 2
unreduziert
- 3 Akrosin c und d im Verhältnis 1 : 2
reduziert

(15). Die Verwendung des chromogenen Substrats S-2222 erfolgte im Hinblick auf den Ersatz des relativ aufwendigen Bz-Arg-OEt/ADH-Tests durch einen methodisch einfachen Test.

Tabelle 4 gibt die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit und den molaren Substratumsatz bei der Hydrolyse verschiedener Substra-

Tabelle 3 Aminosäurezusammensetzung von Akrosin
(s. D.3.3.3.)

Amino- säure	m o l A m i n o s ä u r e / m o l A k r o s i n			
	experimentelle Werte			extrapolierter Wert
	20 h	72 h	96 h	
Asp	31,1	31,0	30,0	31
Thr	18,9	18,1	17,3	19
Ser	26,2	22,9	21,5	26
Glu	30,6	30,6	30,6	31
Pro	30,8	29,0	28,7	31
Gly	38,3 ^a			38
Ala ^b	26,1	25,8	25,9	26
Cys	7,8			8
Val	21,2	21,8	22,6	23
Met	3,8	2,1	2,2	4
Ile	19,1	20,9	21,3	21
Leu	20,9	20,5	20,8	21
Tyr	10,0	9,4	9,1	10
Phe	11,0	9,4	9,0	11
His	7,2	6,2	6,1	7
Lys	16,5	16,8	16,9	17
Arg	19,0	19,0	19,0	19
Trp	n.d.	n.d.	n.d.	-
Total				343

^a niedrigst bestimmter Wert (Glycin im Puffer der präparativen Elektrophorese anwesend)

^b nach Perameisensäureoxidation

te durch Humanakrosin an. Alle Werte wurden auf die Bz-Arg-OEt-Spaltung (1 U) bezogen. Die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit ist für die drei Substrate ungefähr gleich groß, d.h. alle drei Testsysteme besitzen annähernd die gleiche Empfindlichkeit. Bei S-2222 sind die Werte für eine Substratkonzentration von 0,1 mM (Endkonzentration) angegeben in Analogie zu den Testbedingungen bei den Kallikreinen. Die Konzentration (0,1 mM) liegt deutlich

Tabelle 4 Substrathydrolyse durch Humanakrosin

Änderung der Extinktion und des molaren Substratumsatzes sind bezogen auf die Bz-Arg-OEt-Spaltung (1 U).

Substrat	Substrat-konz. [mM]	Akrosin-katalysierte Hydrolyse	
		$\Delta E/\text{min} \times U$ (Bz-Arg-OEt)	$\mu\text{Mol}/\text{min} \times U$ (Bz-Arg-OEt)
Bz-Arg-OEt	0,5	1,1	1
Ac-Phe-Arg-OEt	0,5	1,55	1,5
S-2222	0,1	1,2	0,36

Tabelle 5 K_M - und $v_{\max}$ -Werte, berechnet nach Wilkinson (156)

Substrat	K_M [mol/l]	$v_{\max} \cdot 10^{-5}$ [$\Delta E/\text{min}$]
Bz-Arg-OEt	$5,7 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 12,3\%$)	8,6 ($\pm 2,9\%$)
Ac-Phe-Arg-OEt	$1,0 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 8,3\%$)	13,0 ($\pm 2,6\%$)
S-2222	$4,0 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 5,5\%$)	76,8 ($\pm 1,8\%$)

unter dem korrespondierenden K_M -Wert (0,4 mM) (Tab.5).

In Tabelle 5 sind die nach Wilkinson (156) berechneten K_M - und $v_{\max}$ -Werte angegeben. Die graphischen Darstellungen nach Lineweaver-Birk und Eadie-Hofstee sind in Abb.19 - 21 dargestellt.

In der Literatur sind K_M -Werte für die Hydrolyse von Bz-Arg-OEt (direkter Test) von $2,8 \times 10^{-5}$ bis $4,3 \times 10^{-5}$ mol/l (111, 167, 168) angegeben; sie liegen damit im Bereich des K_M -Wertes, der in der vorliegenden Arbeit mittels des kombinierten Bz-Arg-OEt/ADH-Tests bestimmt wurde ($5,7 \times 10^{-5}$ mol/l).

C.5. Untersuchungen zur Bildung multipler Akrosinformen

Das ausgearbeitete Disk-Elektrophoresesystem erlaubte es, die im Laufe der Isolierung auftretenden Akrosinformen eindeutig zu differenzieren. Es sollte nun auch näher untersucht werden, unter welchen Bedingungen die verschiedenen multiplen Formen gebildet werden und ob die Bildung einzelner Formen verzögert oder verhindert werden kann.

Dazu wurde der Rohextrakt und die Eluate der Ionenaustausch- (SP-Sephadex) und Affinitätschromatographie (p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose) bei verschiedenen pH-Werten inkubiert. Als Analysenmethode diente die Disk-Elektrophorese mit anschließender zymographischer Färbung, da hierbei die einzelnen Akrosinformen am besten unterscheidbar sind.

Bemerkenswert ist, daß Akrosin bereits im Rohextrakt in aktiver Form vorlag, also kein Zymogen (Proakrosin) vorhanden war. Während der Inkubation oder der Isolierungsprozedur wurde in keinem Fall eine Aktivitätszunahme aufgrund einer Proenzym-Aktivierung beobachtet.

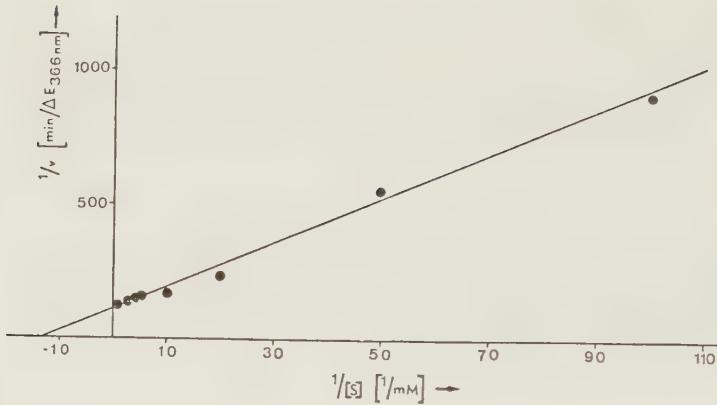


Abb. 19a

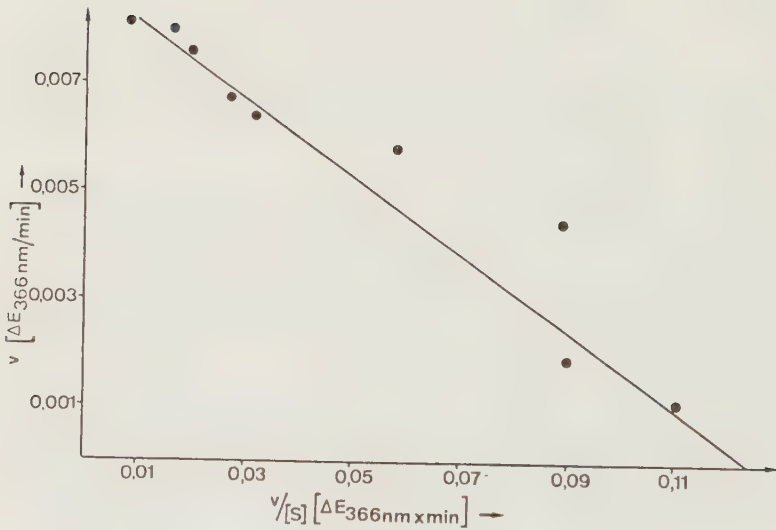


Abb. 19b

Abb. 19 Graphische Darstellung der Akrosin-katalysierten Bz-Arg-OEt-Hydrolyse nach Lineweaver-Burk (a) und Eadie-Hofstee (b) (s. D.3.1.1.)

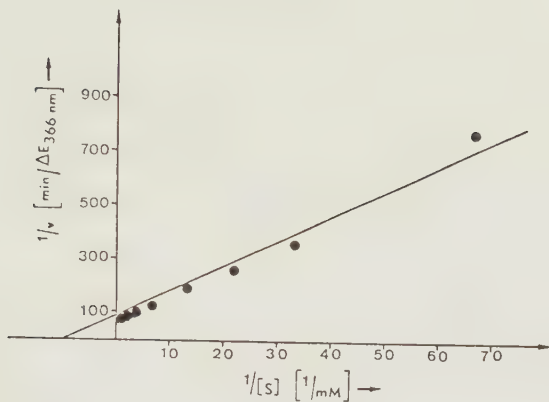


Abb. 20a

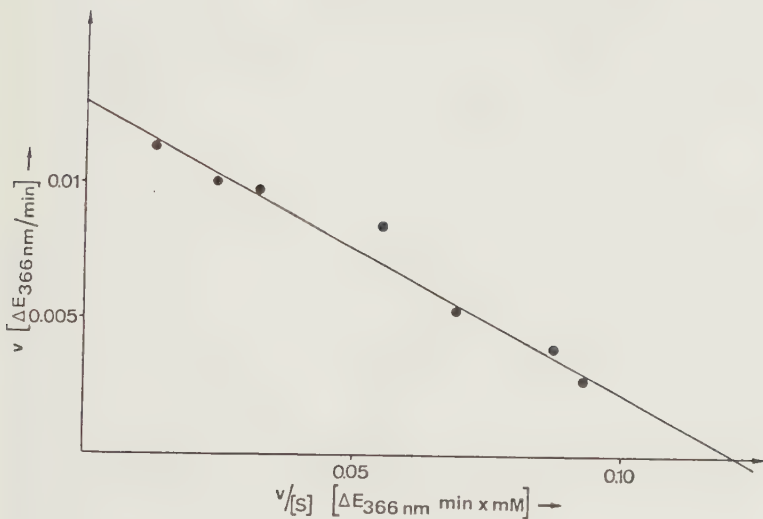


Abb. 20b

Abb. 20 Graphische Darstellung der Akrosin-katalysierten Ac-Phe-Arg-OEt-Hydrolyse nach Lineweaver-Burk (a) und Eadie-Hofstee (b) (s. D.3.1.2.)

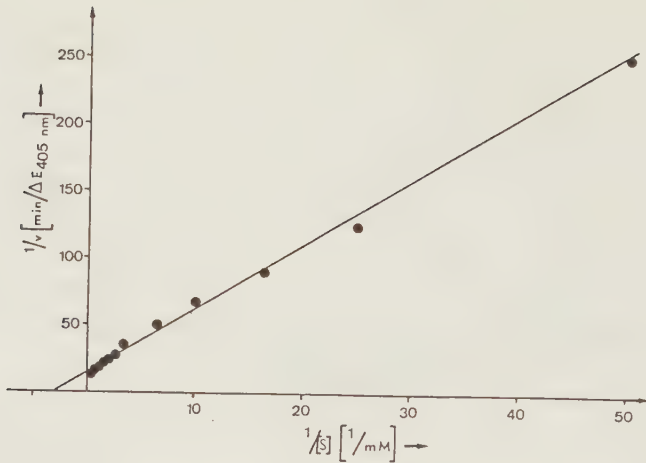


Abb. 21a

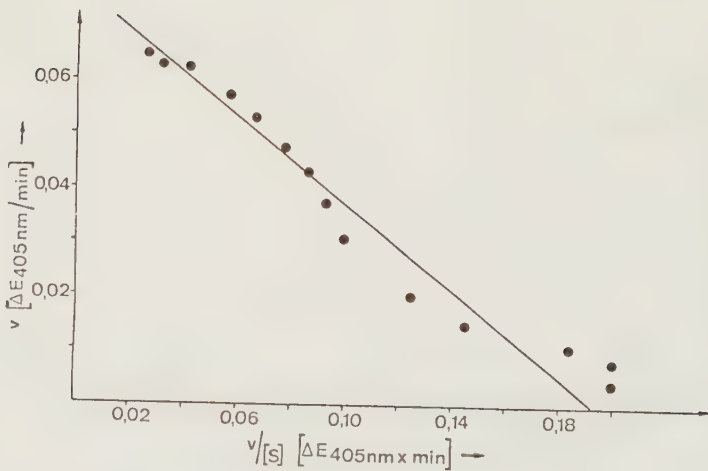


Abb. 21b

Abb. 21 Graphische Darstellung der Akrosin-katalysierten S-2222-Hydrolyse nach Lineweaver-Burk (a) und Eadie-Hofstee (b) (s. D.3.1.4.)

C.5.1. Inkubation des Rohextraktes

Die Inkubation des Rohextraktes erfolgte bei pH 3,6, 5,5, 6,5 und 7,8 bei 4°C. Zu Beginn der Inkubation ($t = 0$) sowie nach 21 und 91 Stunden wurden aliquote Teile für die elektrophoretische Untersuchung entnommen (s. D.3.4.1.). Die zugehörigen Zymogramme der Disk-Elektrophoresen sind in Abb.22 dargestellt.

Zu Beginn der Inkubation ($t = 0$) liegt Akrosin bei pH-Werten $\geq 5,5$ überwiegend in der a-Form vor neben Akrosin b; bei pH 3,6 ist Akrosin b die dominierende Form neben geringeren Mengen an Akrosin a und c. Im Verlaufe der Inkubation zeigt sich eine deutliche pH-Abhängigkeit bei der Umwandlung der Akrosinformen: Während bei pH 3,6 eine Umwandlung von Akrosin a vornehmlich in Akrosin b und in geringem Maß auch in Akrosin c erfolgt, findet bei höheren pH-Werten offensichtlich eine direkte Transformation von Akrosin a in Akrosin c statt, wobei bei pH 5,5 das Ausgangsprodukt relativ stabil ist, während bei pH 7,8 eine fast vollständige Umwandlung zu Akrosin c nach 91 Stunden erfolgt. Erstaunlich ist, daß unter den gegebenen Inkubationsbedingungen keine Bildung von Akrosin d beobachtet wurde.

Es stellt sich nun die Frage nach der Natur von Akrosin a, das nur im Rohextrakt auftrat. Diese Akrosinform könnte z.B. einem Akrosin-Inhibitor-Komplex entsprechen. Da Akrosin a aber enzymatisch aktiv ist, müßte es sich um einen temporären Akrosin-inhibitor handeln, der durch Akrosin abgebaut werden kann. Diese Vermutung sollte geprüft werden durch Vergleichsuntersuchungen mit gereinigtem Akrosin und isoliertem Akrosininhibitor (HUSI II) aus menschlichem Seminalplasma. Dazu wurden äquivalente Mengen Akrosin und Inhibitor bei pH 6,5 inkubiert. Im Elektrophorese-Zymogramm zeigt dieser Ansatz des Akrosin-Inhibitor-Komplexes tatsächlich eine Proteinbande mit einem R_f -Wert von 0,18, die Akrosin a entspricht; sie war allerdings nicht enzymatisch aktiv. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Untersuchungen von Schiessler et al. (1955), die feststellten, daß HUSI II

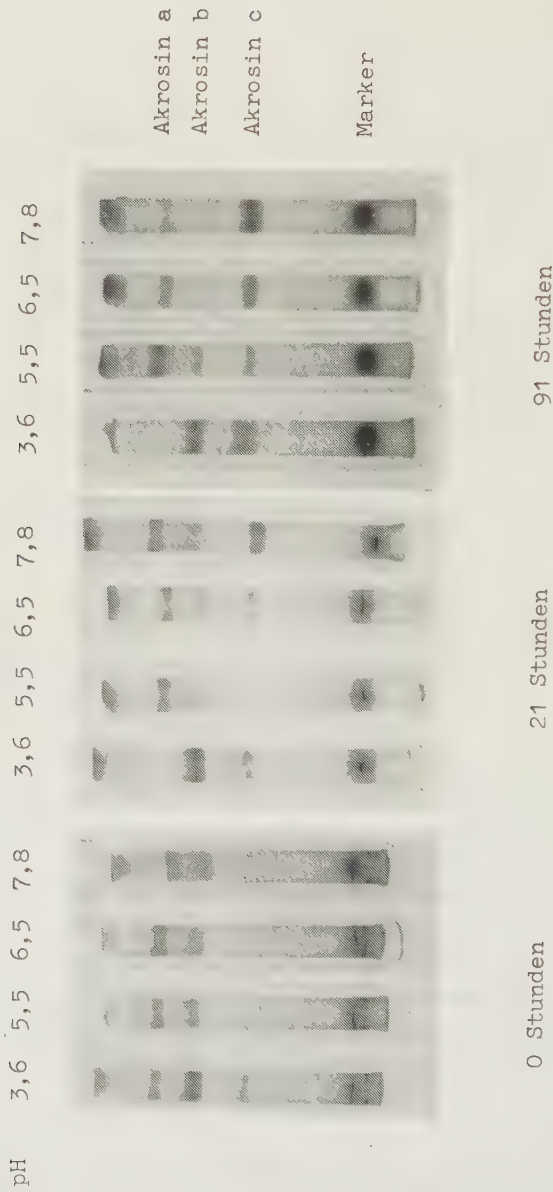


Abb. 22 Inkubation des Rohextraktes bei verschiedenen pH-Werten (s. D. 3.4.1.)
Disk-Elektrophoresen mit enzymatischen Färbungen

ein permanenter Akrosininhibitor ist. Da die in Rohextrakten von Humanspermien vorkommende Akrosinform a aber enzymatisch aktiv ist, scheidet die Interpretation als Enzym-Inhibitor-Komplex aus, zumindest was HUSI II als Partner im Komplex betrifft. Nicht auszuschließen ist jedoch, daß ein temporärer spermieneigener Akrosininhibitor hier beteiligt ist.

Parrish et al. (144) stellten bei Untersuchungen von Rohextrakten aus Eberspermien fest, daß Proakrosin mit einem nicht näher definierten Protein mit M.G. 29 000 assoziiert ist. Deshalb wäre es auch denkbar, daß Akrosin a ein Assoziat von Humanakrosin b bzw. c mit einem anderen Protein des Rohextraktes verkörpert, in dem Akrosin seine enzymatische Aktivität beibehält.

Generell war zu beobachten, daß die Zusammensetzung des Rohextraktes im Hinblick auf multiple Formen nicht konstant war. Akrosin a, b und c wurden in verschiedenen Rohextrakten einzeln oder in Kombination miteinander vorgefunden. Akrosin d hingegen konnte im Rohextrakt in keinem Fall beobachtet werden.

C.5.2. Inkubation von partiell gereinigtem Akrosin (SP-Sephadex G-50-Eluat)

Die Inkubation von partiell gereinigtem Akrosin erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie beim Rohextrakt angegeben (Versuchsdurchführung s. D.3.4.2.). In Abb.23 sind die zugehörigen Zymogramme der Disk-Elektrophoresen abgebildet.

Die Ergebnisse der Inkubation des SP-Sephadex C-50-Eluates zeigen, daß die Bildung von Akrosin c und d pH-abhängig ist. Bei höherem pH-Wert wird mit zunehmender Inkubationsdauer Akrosin b in c und d umgewandelt. Bei pH 7,8 ist bereits nach 21 Stunden kein Akrosin b mehr nachweisbar. Bei pH 3,6 hingegen scheint keine Transformation von Akrosin b bzw. c zu erfolgen; das Zymogramm ist auch nach 91 Stunden Inkubationsdauer unver-

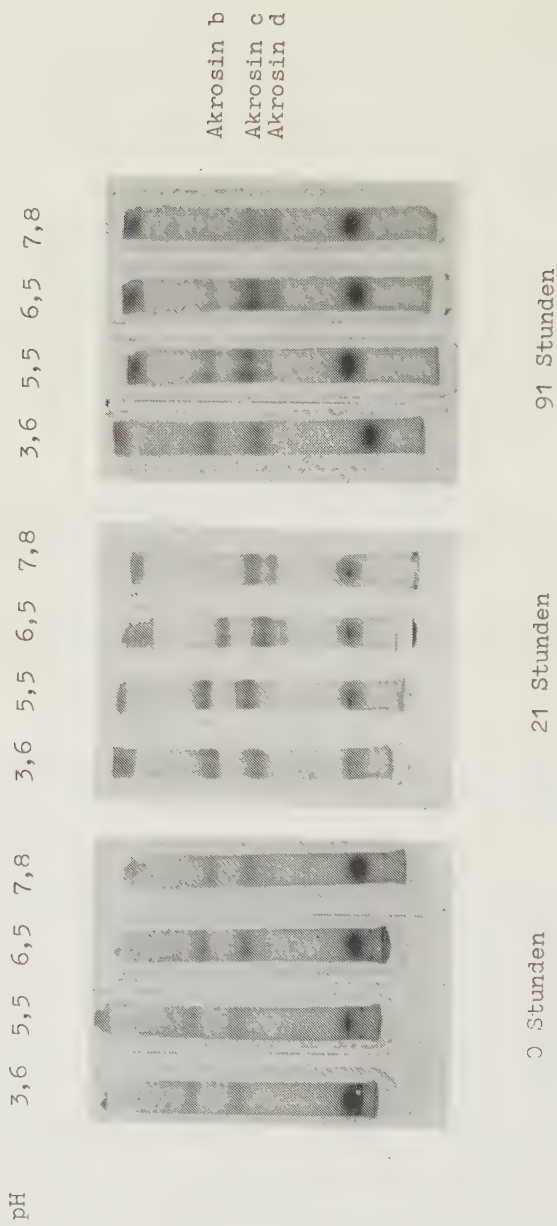


Abb. 23 Inkubation des SP-Sephadex C-50 Eluates bei verschiedenen pH-Werten (s. D.3.4.2.) Disk-Elektrophoresen mit enzymatischen Färbungen

ändert. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Inkubationsresultaten des Rohextraktes, wo Akrosin b und c als Endprodukte der Umwandlung von Akrosin a auftraten. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine Umwandlung in Richtung der Reaktionsfolge Akrosin $a \rightarrow b \rightarrow c \rightarrow d$ erfolgt. Die zymographischen Färbungen werden mit zunehmender Inkubationsdauer und bei höherem pH des Inkubationsmediums schwächer. Vermutlich findet unter diesen Bedingungen eine unspezifische Proteolyse von Akrosin zu inaktiven Fragmenten statt.

C.5.3. Isolierung unter Zusatz von Benzamidiniumchlorid

Nach dem Auftauen wurde das Sperma in zwei aliquote Mengen aufgeteilt, die separat aufgearbeitet wurden. Aus dem einen Teil wurde Akrosin nach der üblichen Isolierungsprozedur gewonnen. Zum anderen Teil wurde Benzamidiniumchlorid in einer Endkonzentration von 50 mM zugegeben. Alle Chromatographie-Puffer enthielten ebenfalls 50 mM Benzamidiniumchlorid. Zur Aktivitätsbestimmung konnte der Bz-Arg-OEt/ADH-Test trotz Anwesenheit von Benzamidin verwendet werden, da nur sehr geringe Probenvolumina in das Testsystem eingesetzt wurden und dadurch das Gleichgewicht vollkommen zugunsten der dissoziierten Partner des Enzym-Inhibitor-Komplexes verschoben wurde. Der Rohextrakt und das SP-Sephadex C-50 Eluat wurden disk-elektrophoretisch untersucht. Beim SP-Sephadex Eluat war eine vorherige Dialyse gegen Benzamidin-freien Puffer (pH 5,5) notwendig, um bessere Enzymfärbungen im Gel zu erhalten.

In Abb.24 sind die Zymogramme der Disk-Elektrophorese zusammengestellt. Durch den Zusatz von Benzamidiniumchlorid bei der Aufarbeitung wird die Transformation von Akrosin b in Akrosin c nicht gehemmt, wohl aber die weitere Umsetzung zu Akrosin d, die in Gegenwart von Benzamidiniumchlorid vollständig unterbunden wird. Wie aus dem Vergleich der Elektrophoresen in Abb.24 hervorgeht, wird unter den gegebenen experimentellen Bedingun-

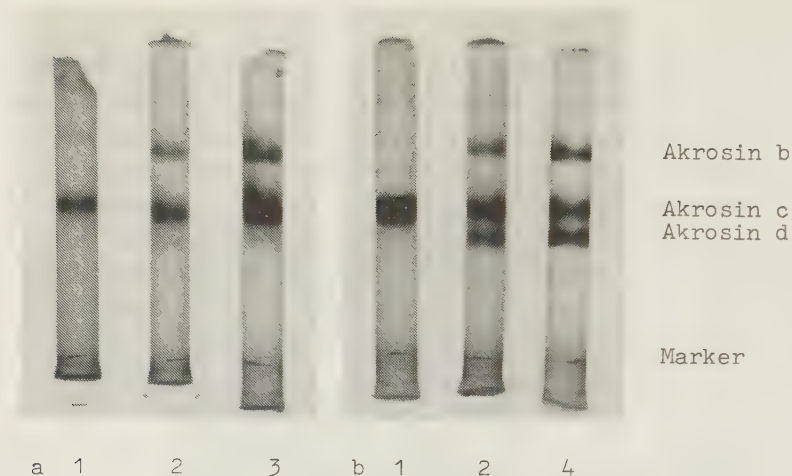


Abb.24 Isolierung von Humanakrosin mit (a) und ohne (b) Zusatz von Benzamidiniumchlorid Disk-Elektrophoresen mit zymographischer Färbung (s. D.3.4.3.)

- 1 Rohextrakt
- 2 SP-Sephadex C-50-Eluat
- 3 SP-Sephadex C-50-Eluat nach Dialyse
- 4 p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose-Eluat

gen die enzymatische Aktivität von Akrosin b im Rohextrakt weitgehend unterdrückt; erst nach partieller Reinigung an SP-Sephadex wird die Aktivität von Akrosin b "demaskiert" (s. auch C. 5.1.).

Die Anwesenheit von Benzamidiniumchlorid bei der Isolierung von Akrosin wäre sicherlich vorteilhaft, da die Umwandlung von Akrosin c in d während der Aufarbeitung dann gehemmt wird. Andererseits wird Akrosin in Gegenwart von Benzamidiniumchlorid nicht mehr an p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose gebunden. Die Entfernung von Benzamidiniumchlorid durch Dialyse bei pH 5,5 war nicht möglich, da der Enzym-Inhibitor-Komplex unter diesen Bedingun-

gen noch recht stabil ist. Eine Abtrennung des Benzamidins war zwar durch Dialyse bei pH 2,6 möglich, aber durch diese Behandlung wurde Akrosin inaktiviert; es waren nur noch 16% der ursprünglichen Akrosinaktivität danach vorhanden. Andererseits kann auf die Chromatographie an p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose nicht verzichtet werden, da dieser Schritt den größten Anreicherungsfaktor der Isolierungsprozedur aufweist.

C.5.4. Umwandlung von Akrosin c in Akrosin d

Es sollte auch untersucht werden, ob die Umwandlung von Akrosin c in d durch Zusatz von Ca^{++} , EDTA oder Benzamidiniumchlorid zum Inkubationssystem beeinflusst werden kann. Dazu wurde affinitätschromatographisch gereinigtes Akrosin mit 0,1 M NaAc, 0,1 M NaCl, 3 mM NaN_3 , 0,1% (w/v) Triton X-100, pH 5,5, unter Zusatz von 50 mM Ca^{++} bzw. 20 mM EDTA bzw. 50 mM Benzamidiniumchlorid versetzt und mehrere Wochen bei 4°C inkubiert. Die Analyse der Akrosinformen erfolgte mittels Disk-Elektrophorese und Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue. In Abb.25 sind die Elektrophoresemuster des Ausgangsproduktes ($t = 0$) und der 3 Wochen inkubierten Proben abgebildet.

Triton X-100, Ca^{++} oder EDTA verhindern bei pH 5,5 die Umwandlung von Akrosin c in d offenbar nicht. Die Transformation kann aber durch Zusatz von Benzamidiniumchlorid weitgehend unterbunden werden. Die Bildung von Akrosin d erfolgte aber bei pH 5,5 sehr langsam; nach einer Woche war fast keine Veränderung zu beobachten und erst nach zwei Wochen war eine Zunahme von Akrosin d eindeutig feststellbar. Der Zusatz von Benzamidiniumchlorid wäre deshalb für die Isolierung von Akrosin c zwar einerseits sinnvoll, andererseits wäre dann aber bei der nachfolgenden präparativen Elektrophorese keine rasche Enzymaktivitätsfärbung mehr durchführbar, was jedoch für die exakte Lokalisation der multiplen Formen im Gel notwendig ist.

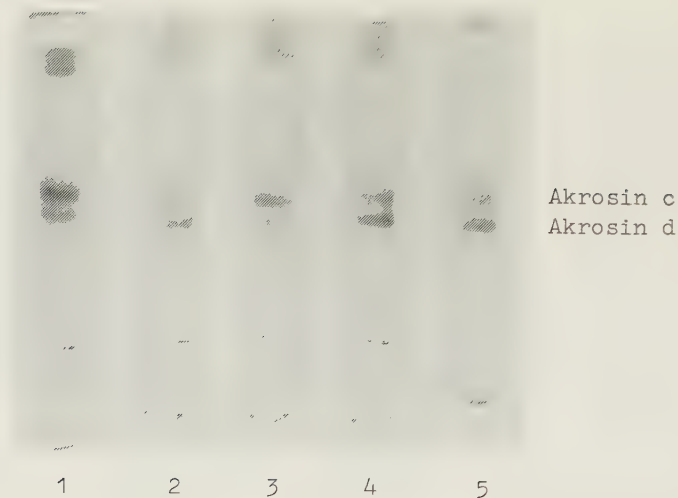


Abb.25 Umwandlung von Akrosin c in Akrosin d
in Gegenwart von 0,1% (w/v) Triton X-100
bei pH 5,5 (s. D.3.4.4.)
Disk-Elektrophoresen mit nachfolgender
Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant
Blue R-250

- 1 Ausgangssubstanz
- 2 nach 3 Wochen 4°C
- 3 nach 3 Wochen 4°C, 50 mM Benzamidinium-
chlorid
- 4 nach 3 Wochen 4°C, 50 mM Ca⁺⁺
- 5 nach 3 Wochen 4°C, 20 mM EDTA

D. MATERIAL UND METHODEN

D.1. Apparate

Photometer:

Verwendet wurden Eppendorf Photometer 6118 mit Enzymrechner 6452 und Drucker 6522 für die Messungen bei 405 oder 366 nm. Für Messungen bei anderen Wellenlängen wurde ein Zeiss Spektralphotometer PMQ3 mit Kienzle Drucker verwendet.

Säulenchromatographie:

Die optische Dichte der Eluate wurde mit einem Durchflußphotometer Uvicord II oder Uvicord S von LKB bei 254 bzw. 280 nm gemessen. Automatisch fraktioniert wurde mit einem Ultrorac Fraktionssammler von LKB oder von Gilson.

Die Durchflußgeschwindigkeit der Säulen wurde mit Perpex-Pumpen von LKB mit austauschbaren Getrieben reguliert.

Ultrafiltration:

Amiconzelle, 10 ml, 100 ml, PM-10 Membran, N_2 (4 atm);

Elektrophoresen:

Disk- und SDS-Elektrophoresen: Rundgel-Elektrophoresekammer von Shandon mit Glasröhrchen 80 x 5,0 mm, Spannungsgerät Typ 3371 von LKB.

Präparative Elektrophoresen wurden mit einer Flachgelelektrophoresekammer 8,5 x 10 x 0,3 cm von Desaga ausgeführt, Spannungsgerät Typ 3371 von LKB, Kühlaggregat.

Aminosäureanalysen:

Aminosäureanalysator Durrum D 500

D.2. Substanzen

D.2.1. Substrate

N^α-Benzoyl-L-arginin-äthylester (Art.1672), N^α-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid (Art.10754) Merck, Darmstadt; Bz-Ile-Glu-(γ-OR)-Gly-Arg-NHNp HCl (S-2222) (Art.16-3890) Kabi Diagnostica, Stockholm, Schweden; N^α-Benzoyl-DL-Arginin-β-Naphthylamid·HCl (Art. B-4750) Sigma Chemical Co.; N^α-Acethyl-L-phenylalanyl-L-arginin-äthylester-Acetat Bachem, Feinchemikalien AG, Bubendorf, Schweiz;

D.2.2. Materialien für die Säulenchromatographie

Sephadex G-75 medium (Art.2143), Sephadex G-25 coarse (Art. 2127), CM-Sephadex C-50 (Art.2561), SP-Sephadex C-50 (Art.2581), CM-Sepharose CL-6B (Art.2593) Pharmacia, Uppsala, Schweden; Fractogel PGM 2000 (Art.9388) Merck, Darmstadt;

D.2.3. Materialien für die Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

Acrylamid (Art.10675), N,N'-Methylenbisacrylamid (Art.29195), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Art.17525), Servalyt pH 2-11 (Art.42900), Cytochrom C (Art.18020), Natriumdodecylsulfat (Art.20760) Serva, Heidelberg; N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (Art.808742), Ammoniumperoxodisulfat (Art.1201), Riboflavin (Art.7609), Merck, Darmstadt; Dithiothreitol (Art.161-0611), Methylgrün (Art.161-0405), Bromphenolblau (Art.161-0404), Molekulargewichtsstandard (Art.161-0304), BioRad Laboratories, Richmond; Standard für IEF, pH 3-10 (Art.2221), Pharmacia; Fast Garnet GBC Salz (Art.F-6504) Sigma, Chemical Co.;

D.2.4. Andere Materialien

2-Morpholinoäthansulfonsäure (Art.6128), Benzamidiniumchlorid (Art.820122), Merck, Darmstadt; CH-Sepharose-4B (Art.2311) Pharmacia, Uppsala, Schweden; p-Aminobenzamidin-HCl (Art.A-1384) Sigma Chemical Co.; N-Cyclo-hexyl-N'-(2-morpholinoäthyl)-carbo-dimid Metho-p-toluolsulfonat (Art.C 10, 640-2) EGA Chemie, Steinheim; Diisopropylfluorophosphat (Art.77205) Serva, Heidelberg; Alkoholdehydrogenase (Art.127540), β -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (Art.127973) Boehringer, Mannheim; Albumin aus Rinder Serum (Art. M./R6416), Behringwerke AG, Marburg; Alle Substanzen waren vom höchsten, im Handel erhältlichen Reinheitsgrad. Destilliertes oder deionisiertes Wasser wurde für alle Prozeduren verwendet.

D.3. Methoden

D.3.1. Enzym- und Hemmtests

D.3.1.1. Bz-Arg-OEt/ADH-System

Als synthetisches Substrat für die Aktivitätsbestimmung von Humanakrosin diente Bz-Arg-OEt in Kombination mit ADH und NAD^+ . Es wurde hierfür die Methode von Fritz et al. (1) verwendet. 2,4 ml Pyrophosphatpuffer (75 mM Semicarbazid/22,5 mM Glycin, pH 8,7), 0,2 ml BAEE-Lösung (7,5 mM), 0,1 ml NAD^+ -Lösung (30 mM) und (0,18-x) ml dest. Wasser werden gemischt, mit 0,02 ml ADH-Suspension (30 mg/ml) versetzt und 5 Minuten stehengelassen. Anschließend gibt man die Probelösung mit Enzym zu. Die Extinktion pro Minute wird bei 366 nm und 25°C verfolgt. Eine Neubestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von NADH ergab einen Wert von $3,44 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (2), der deutlich höher als der früher verwendete Wert von $3,30 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ liegt. Die Extinktionsänderung von 0,001147 entspricht somit einer Enzymaktivität von 1 mU.

Für die K_M -Bestimmung wurde eine Akrosinpräparation mit Akrosin c und Akrosin d im Verhältnis 2:1 mit einer spez. Aktivität von 110 U (BAEE)/mg verwendet. Die Substratkonzentration betrug 0,15 - 15 mM, entsprechend einer Endkonzentration von 0,01 - 1 mM in der Küvette.

D.3.1.2. Ac-Phe-Arg-OEt/ADH-System

Zur Bestimmung des K_M -Wertes wurde ein Gemisch von Akrosin c und Akrosin d mit einer spez. Aktivität von 110 U (BAEE)/mg verwendet. Die Substratkonzentration variierte von 0,015-0,9 mM in der Küvette. Der Test wurde analog dem Bz-Arg-OEt/ADH-System durchgeführt, nur wurde im Halbmikromaßstab gearbeitet. 1,0 ml Phosphatpuffer (s.D.3.1.1.), 50 μ l NAD^+ -Lösung (30 mM), 50 μ l Substratlösung (von 0,9-9 mM), 10 μ l Alkoholdehydrogenasesuspension (30 mg/ml) und 0,34 ml dest. Wasser wurden 5 Minuten bei 25°C vorinkubiert. Anschließend gibt man 50 μ l Humanakrosinlösung (enthält 7,2 mU (BAEE)) zu, inkubiert nochmals 2 Minuten und verfolgt die Extinktionszunahme bei 366 nm. Ein $\Delta E_{366 \text{ nm}}/\text{Min.}$ von 0,001147 entspricht 1 mU.

D.3.1.3. Bz-Arg-NHNp-System

Die Bz-Arg-NHNp-Hydrolyse durch Akrosin wurde nach der von Schleuning und Fritz (3) erarbeiteten Methode gemessen. Zu dem Testpuffer wurden 50 mM CaCl_2 zugefügt und als Substratlösung wurde 0,5 mg/ml L-Bz-Arg-NHNp verwendet. Eine Extinktionsänderung $\Delta E_{405 \text{ nm}}/\text{Min.}$ von 0,00332 entspricht 1 mU (25°C). Dieses Testsystem wurde für die Bestimmung der Akrosin-Inhibitoren verwendet. Als Enzym wurde gereinigtes Eberakrosin eingesetzt (4). Eine Verminderung der Extinktionsänderung/Min. von 0,00332 entspricht einer Inhibitoraktivität von 1 mIU.

D.3.1.4. Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-NHNp.HCl-System (S-2222)

Der K_M -Wert für das Substrat S-2222 wurde bestimmt. Als Akrosinpräparation diente ein Gemisch von Akrosin c und Akrosin d mit einer spez. Aktivität von 110 U (BAEE)/mg. Die Substratkonzen-

tration variierte von 0,02-2,5 mM in der Küvette. In Halbmikro-küvetten werden 930 μ l 0,2 M TRA, 0,05 M CaCl_2 , 0,1% Triton X-100, pH 7,8 mit 20 μ l Akrosinlösung (12 mU (BAEE)) versetzt. Die enzymatische Reaktion wird durch Zusatz von 50 μ l Substratlösung mit einer Konzentration von 0,4-50 mM gestartet. Die Extinktionsänderung wird bei 405 nm und 25°C verfolgt. Ein $\Delta E_{405 \text{ nm}}/\text{Min.}$ von 0,00332 entspricht 1 mU.

D.3.2. Isolierung von Humanakrosin

D.3.2.1. Sammlung und Extraktion der Spermien

Ein Teil des Sperma stammte von Patienten der Andrologischen Abteilung an der Dermatologischen Klinik der Universität München. Die Spermien wurden ca. 3 - 4 h post ejaculationem bei 600 g vom Seminalplasma abzentrifugiert, gesammelt und bei -30°C gelagert. Der andere Teil des Sperma stammte von gesunden Spendern. Die Spermien wurden ebenfalls bei 600 g (4°C) 30 Minuten lang zentrifugiert, zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, bei -196°C schockgefroren und bei -30°C gelagert. Für die Isolierungen wurde Spermamaterial verwendet, das bis zu 4 Jahre gelagert war.

Alle Arbeiten während der Isolierung wurden bei 4°C durchgeführt. Es wurden ausschließlich Plastikgefäße oder silikonisierte Glasgefäße verwendet.

Für die Extraktion wurde Sperma (5 - 10 ml Sediment, in einem Gesamtvolumen von ca. 30 ml) bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 1/10 ihres Volumens an Puffer, der 1% (w/v) Triton X-100 enthält (0,1 M NaAc, 0,1 M NaCl, 3 mM NaN_3 , 1% (w/v) Triton X-100, pH 5,5) und mit ca. 30 ml Extraktionspuffer (0,1 M NaAc, 0,1 M NaCl, 3 mM NaN_3 , 0,1% (w/v) Triton X-100, pH 5,5) versetzt. Mit 2 N HCl wurde der pH-Wert auf 5,5 eingestellt und anschließend 30 Minuten gerührt. Der Überstand wurde bei 2000 g 30 Minuten abzentrifugiert und das Spermis sediment nochmals mit ca. 30 - 40 ml Extraktionspuffer behandelt. Die vereinigten Rohextrakte wur-

den bei 20 000 g 30 Minuten lang zentrifugiert und anschließend mit 2 N HCl auf pH 3,6 eingestellt.

D.3.2.2. Chromatographie an SP-Sephadex C-50

Der gesammelte Rohextrakt (ca. 140 ml) wurde mit 30 - 40 ml SP-Sephadex C-50 Gelsuspension, äquilibriert mit 0,1 M NaAc, 0,15 M NaCl, 3 mM NaN_3 , 0,1 % (w/v) Triton X-100, pH 3,6, unter langsamem Rühren versetzt. Nachdem die Akrosinaktivität im Überstand auf weniger als 5% der Ausgangsaktivität abgesunken war, wurde der Überstand abzentrifugiert und die Gelsuspension in eine Plastiksäule (1,5 x 50 cm) gefüllt und über Nacht mit dem Äquilibriumspuffer gewaschen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 18 ml/h. Anschließend wurde ein linearer Salzgradient von 0,15 - 0,8 M NaCl im Elutionspuffer (je 350 ml Pufferlösung) angeschlossen und Fraktionen mit einem Volumen von 6 ml gesammelt. Die Akrosin- und Inhibitoraktivität wurde ausgetestet und die entsprechenden Fraktionen gesammelt. Die Akrosin-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und mit verdünnter Ammoniaklösung auf pH 6,0 eingestellt und unmittelbar auf die p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose-säule aufgetragen.

D.3.2.3. Chromatographie an p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose

Die biospezifische Affinitätschromatographie wurde mit p-Aminobenzamidin, das kovalent an Carboxyhexyl-Sepharose gebunden war, durchgeführt. Das Gel wurde nach der Vorschrift von Axén und Porath (5) hergestellt.

Das Affinitätsgel wurde in der Säule (0,8 x 10 cm) mit 0,05 M NH_4Ac , 1 M NaCl, 0,1% (w/v) Triton X-100, pH 6,0 äquilibriert und die akrosinhaltige Lösung von der Ionenaustauschchromatographie (ca. 158 ml) mit einer Geschwindigkeit von 22 ml/h aufgetragen. Anschließend wurde die Säule 6 Stunden mit dem Äquilibriumspuffer gewaschen; die Fließgeschwindigkeit betrug hierbei 13 ml/h. Die Elution erfolgte mit 0,1 M Glycin, 0,1 M NaCl,

0,1% (w/v) Triton X-100, pH 3,0. In die Vorlage wurde 1,0 ml 0,1 M NaAc, 0,1 M NaCl, 0,1% (w/v) Triton X-100, 3 mM NaN_3 , pH 5,5 gegeben. Das Endvolumen der einzelnen Fraktionen betrug 4,0 ml. Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt, auf pH 5,5 eingestellt und weiterverarbeitet.

D.3.2.4. Präparative Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die präparative Elektrophorese wurde in einer Flachgelelektrophoreseapparatur (8,5 x 100 x 0,3 cm) durchgeführt. Als Gel-system diente das System Nr.8 nach Maurer (6) mit einem 7,5%-igen Polyacrylamidgel, pH 5,0 (Sammelgel) bzw. 3,6 (Trenngel) unter Zusatz von 0,25% (w/v) Triton X-100 in den Gelpuffern.

Die vereinigten aktiven Fraktionen der Affinitätschromatographie (ca. 12 ml), durch Ultrafiltration an einer Amicon PM-10-Membran auf 1,0 ml konzentriert (maximal 1,2 mg Protein) wurden mit 50 mg Saccharose und 50 μl 0,05%iger Methylgrünlösung versetzt und auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Durchführung der Elektrophoresen erfolgte bei 4°C. Die Stromstärke wurde für das Sammelgel auf 20 mA und für das Trenngel auf 40 mA eingestellt. Die Laufzeit im Sammelgel betrug ca. 45 Minuten, im Trenngel ca. 60 - 100 Minuten. Sobald der Marker die untere Grenze erreicht hatte, wurde die Elektrophorese abgebrochen, die Farbstofffront mit Tusche markiert und ein schmaler Längsstreifen für die enzymatische Färbung aus dem Gel herausgeschnitten. Die zymographische Färbung des aktiven Enzyms ermöglichte die exakte Lokalisation der multiplen Formen im Gel. Zur Elution der verschiedenen Banden wurde das Gel mechanisch zerrieben und zweimal mit 0,1 M NaAc, 0,1 M NaCl, 3 mM NaN_3 , 0,1% Triton X-100, pH 5,5 unter Rühren extrahiert. Zu den Extrakten von Akrosin b wurde Benzamidiniumchlorid bis zu einer Endkonzentration von 50 mM zugegeben.

D.3.2.5. Entsalzung und Entfernung der Detergentien

Nicht-flüchtige Salze wurden von Akrosin mit Hilfe der Ultrafiltration entfernt. Dazu wurden die Extrakte der präparativen Elektrophorese in einer Amiconzelle konzentriert, anschließend wurden 5 ml 0,05 M NH_4Ac , 0,05% (w/v) Triton X-100, pH 5,5 zugegeben und der Prozeß dreimal wiederholt. Die Entfernung von Triton X-100 erfolgte anschließend durch dreimaliges Ausschütteln der Akrosin-Lösung (3 ml) mit Essigsäureäthylester (jeweils 5 ml). Anschließend wurden die Proben in silikonisierten Kolben lyophilisiert.

D.3.2.6. Versuche zur chromatographischen Trennung multipler Formen des Akrosins

D.3.2.6.1. Elution im pH-Gradienten an p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose

Chromatographiebedingungen:

Säule: 0,8 x 10 cm; Matrix: p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose; Äquilibriumspuffer: 0,05 M TRA, 1 M NaCl, 0,1% (w/v) Triton X-100, pH 7,8; Durchflußgeschwindigkeit: 11 ml/h; Fraktionsvolumen: 3,7 ml; Probe: 153 U (BAEE/ADH) Akrosin (von der Ionenaustauschchromatographie). Die Säule wird 6 Stunden mit 0,05 M TRA, 0,1 M NaCl, 0,1% (w/v) Triton X-100, pH 7,8 und anschließend 2 Stunden mit 0,1 M NaCl, 0,1 M Na-Citrat, 0,1% (w/v) Triton X-100, pH 4,9 gewaschen. Gradient: Je 100 ml 0,1 M NaCl, 0,1 M Na-Citrat, 0,1% (w/v) Triton X-100, pH 4,9 und pH 2,0. Ein weitgehend linearer pH-Gradient zwischen pH 4,9 und 2,0 konnte damit erzeugt werden.

D.3.2.6.2. Rechromatographie an SP-Sephadex C-50

Chromatographiebedingungen:

Säule: 0,7 x 90 cm; Matrix: SP-Sephadex C-50, Äquilibriumspuffer: 0,1 M NaAc, 0,4 M NaCl, 0,1% (w/v) Triton X-100, 3 mM NaN_3 , pH

3,6; Durchflußgeschwindigkeit: 1,3 ml/h; Fraktionsvolumen: 0,65 ml; Probe: 32,0 U Akrosin (von der Affinitätschromatographie; Gradient: Je 50 ml Äquilibrierpuffer mit 0,4 M und 0,8 M NaCl.

D.3.2.6.3. Chromatographie an CM-Sepharose CL-6B

Chromatographiebedingungen:

Säule: 0,7 x 90 cm; Matrix: CM-Sepharose CL-6B; Äquilibrierpuffer: 0,1 M NaAc, 0,1 M NaCl, 0,1% (w/v) Triton X-100, 3 mM NaN_3 , pH 5,5; Durchflußgeschwindigkeit: 1,3 ml/h; Fraktionsvolumen: 0,65 ml/Fraktion; Probe: 27,6 U Akrosin (von der Affinitätschromatographie); Gradient: Je 60 ml Äquilibrierpuffer mit 0,1 M bzw. 0,6 M NaCl.

D.3.2.6.4. Chromatographie an Sephadex G-75

Chromatographiebedingungen:

Säule: 1,6 x 100 cm; Matrix: Sephadex G-75 medium; Puffer: 0,1 M NaAc, 0,1 M NaCl, 0,1% (w/v) Triton X-100, 3 mM NaN_3 , pH 5,5; Durchflußgeschwindigkeit: 16 ml/h; Fraktionsvolumen: 3,3 ml; Probe: 14 U Akrosin (von der Affinitätschromatographie).

D.3.3. Reinheitsprüfungen und Charakterisierungen

D.3.3.1. Elektrophoresen

D.3.3.1.1. Disk-Elektrophoresen

Die Disk-Elektrophoresen wurden in einer Shandon-Diskelektrophoresekammer mit 5 x 80 mm Glasröhrchen ausgeführt. Als Standard-Gelsystem diente das System Nr.8 nach Maurer (6), ein 7,5%iges oder 10%iges Gel mit einem pH-Wert von 5.0 im Sammelgel und 3,8 im Trenngel unter Zusatz von 0,25% (w/v) Triton X-100. Methyl-

grün diente als Farbstoffmarker. Die Durchführung der Elektrophoresen erfolgte bei 4°C. Die Stromstärke lag bei 5 mA pro Röhrchen, die Laufzeit betrug 60 - 100 Minuten. Die Anfärbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R-250 nach (7) in Methanol/Eisessig/Wasser (45:5:50, v/v/v); entfärbt wurde mit Methanol/Eisessig/Wasser (25:10:65, v/v/v). Enzymatisch aktive Banden wurden nach der Methode von Garner et al. (8) mit BzArgNHNaph als Substrat und Fast Garnet GBC-Salz als Kupplungsfarbstoff angefärbt.

D.3.3.1.2. Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde in einer Desaga-Kammer mit 5 x 100 mm Glasröhrchen ausgeführt. Die Vorschrift entsprach im wesentlichen den Angaben von Radola (153).

Reagenzien-Lösung 1	40% (w/v)	Servalylt
Reagenzien-Lösung 2	30% (w/v)	Acrylamid
Reagenzien-Lösung 3	1% (w/v)	N,N'-Methylen-Bisacrylamid
Reagenzien-Lösung 4	0,004% (w/v)	Riboflavin

Für die Herstellung der Gele werden die Lösungen wie folgend gemischt:

Lösung 1: 0,5 ml, Lösung 2: 1,6 ml, Lösung 3: 1,5 ml, Lösung 4: 1,4 ml, aqua dest.: 5,0 ml;

Die Gelröhrchen haben eine Geldichte von 5% bei einem Vernetzungsgrad von 3%.

Für die Fokussierung werden 20 - 50 mg Akrosin in 0,05 M NH_4 -Formiatpuffer pH 5,0 gelöst, mit ca. 50 mg Saccharose versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Referenz diente ein Protein-Standard mit Trypsinogen (pI 9,3), Lentil-Lectin (pI 8,65, 8,45 und 8,15), Myoglobin (pI 7,35, 6,85), Human-Carboanhydrase B (pI 6,55), Rinder-Carboanhydrase B (pI 5,85), β -Lactoglobulin A (pI 5,2), Sojabohnen-Trypsininhibitor (pI 4,55), Amyloglucosidase (pI 3,5). Für den stark alkalischen Bereich wurde Cytochrom C (pI 10,5) zugefügt.

Die Laufzeit betrug ca. 2 Stunden bei 4°C mit einer Stromstärke von 2,5 mA pro Röhrchen. Als Kathodenlösung diente 0,4 M Äthylen-diamin und als Anodenlösung 0,2 M Schwefelsäure. Zur Fixierung

wurden die Gele über Nacht in 10% Trichloressigsäure gegeben. Die Proteinfärbung erfolgte mit 0,05% Coomassie-Blue G-250 in Methanol/Eisessig/H₂O (45:10:45, v/v/v). Überschüssiger Farbstoff wurde mit Methanol/Eisessig/H₂O (25:10:65, v/v/v) entfernt.

Zur Ermittlung des pH-Gradienten wurde ein unbeladenes Gel in 5 mm starke Gelscheiben zerschnitten und mit je 1 ml CO₂-freiem Wasser versetzt, unter N₂ verschlossen, 3 Stunden geschüttelt und anschließend der pH-Wert gemessen. Mit den gemessenen pH-Werten wurde eine Eichkurve erstellt.

D.3.3.1.3. SDS-Elektrophoresen

Die kontinuierliche SDS-Elektrophorese erfolgte nach Weber, Pringle, Osborn (9). Verwendet wurde ein 10%iges Acrylamidgel mit 0,1% SDS, 0,15% TEMED und 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2. Dithiothreitol (1%) diente als Reduktionsmittel (2 Minuten bei 100°C). Als Farbstoffmarker wurde Bromphenolblau verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 25°C mit einer Stromstärke von 5 mA/Gel bei einer Laufzeit von 3 - 7 Stunden.

Die diskontinuierliche SDS-Elektrophorese nach Laemmli (10) wurde in 5 - 25%igen Polyacrylamid-Gradientengelen durchgeführt. Als Referenz diente ein Proteingemisch aus Lysozym (M.G. ~ 14 300), Sojabohnen-Trypsininhibitor (M.G. ~ 21 000), Carboanhydrase (M.G. ~ 30 000), Ovalbumin (M.G. ~ 45 000), Rinderserumalbumin (M.G. ~ 68 000) und Phosphorylase b (M.G. ~ 94 000).

Akrosin wurde vor der SDS-Elektrophorese mit DFP inaktiviert, um eine unspezifische Autoproteolyse zu verhindern. 10 µl DFP wurden mit 50 µl 2-Propanol und 100 µl 1 mM Phosphatpuffer pH 7,2 versetzt und der pH-Wert mit verdünnter NaOH auf 7,2 eingestellt. Zu dieser Lösung wurden ca. 80 µg Akrosin, gelöst in 50 µl 1 mM Ammoniumformiatpuffer pH 6,0, zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 25°C inkubiert, bis die Aktivität unter 1% des Ausgangswertes abgesunken war (ca. 5 Minuten). Anschließend wurde überschüssiges DFP im Vakuum entfernt, die Probe im Exsiccator getrocknet und in 40 µl Elektrophoresepuffer aufgenommen.

D.3.3.2. Aminosäureanalysen

Die Proteinproben ($\sim 0,5$ nMol) wurden in 6 N HCl bei 110°C 20, 72 und 96 Stunden lang im Vakuum hydrolysiert. Die Aminosäureanalysen wurden mit einem Durrum D500 Analyser durchgeführt (11). Cystein und Methionin wurden nach Perameisensäureoxidation (12) bestimmt.

D.3.3.3. Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde ein modifizierter Lowrytest (13) verwendet, der es gestattet, Proteine auch in Gegenwart von 0,1% Triton X-100 zu bestimmen. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin. Eine lineare Eichkurve im Bereich von 5 - 15 μg wurde erhalten. Die Proteinbestimmung von Akrosinproben, die durch präparative Elektrophorese erhalten worden waren, erfolgte durch quantitative Aminosäureanalyse.

D.3.3.4. Bestimmung von Triton X-100

Die quantitative Triton X-100 Bestimmung wurde nach Garewel (13) mit einigen Modifikationen (14) durchgeführt.

Die Triton-haltige Lösung (max. 100 μl) wurde zu 50 μl 50% (v/v) Äthanol und 200 μl 2,3 M Ammoniumthiocyanat und 0,1 mM Kobaltnitrat-hexahydrat gegeben und 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Der entstehende blaue Komplex von Kobaltthiocyanat mit Triton X-100 wurde mit 750 μl 1,2-Dichloräthan ausgeschüttelt. Nach Zentrifugieren (1000 g, 5 Minuten) wurde die organische Phase in Küvetten (1 ml) überführt und die Differenz der Absorption bei 687 nm und 622 nm bestimmt. Der Meßbereich lag zwischen 5 und 100 μg Triton X-100.

D.3.4. Untersuchungen zur Bildung multipler Formen *in vitro*

D.3.4.1. Inkubation des Rohextraktes

Es wurden jeweils 1,0 ml zentrifugierter Rohextrakt mit 2 N NaOH auf einen pH-Wert von 3,6, 5,5, 6,5 bzw. 7,8 eingestellt. In der Lösung waren 28 mg Protein und eine Aktivität von 2,87 U (BAEE) pro ml enthalten. Die Proben wurden bei 4°C inkubiert und nach 0, 21 und 91 Stunden jeweils 100 µl für eine Polyacrylamidgel-Elektrophorese entnommen. Die Elektrophoresen wurden wie unter D.3.3.1.1. beschrieben durchgeführt. Die Anfärbung der enzymatisch aktiven Banden erfolgte nach der Methode von Garner et al. (s. D.3.3.1.1.).

D.3.4.2. Inkubation des SP-Sephadex C-50-Eluates

Die Versuchsdurchführung war analog der Inkubation des Rohextraktes (s. D.3.4.1.). Die Konzentration betrug 3,3 mg Protein mit einer Aktivität von 4,0 U (BAEE) pro ml Lösung. Für die Elektrophoresen wurden jeweils 50 µl verwendet.

D.3.4.3. Isolierung unter Zusatz von Benzamidiniumchlorid

Humansperma (2 ml) wurde mit Benzamidiniumchlorid bis zu einer Konzentration von 50 mM versetzt. Die Extraktion der Spermien und Chromatographie über SP-Sephadex C-50 wurde analog der Isolierung, in D.3.2.1. und D.3.2.2. beschrieben, durchgeführt, wobei allen Puffern 50 mM Benzamidiniumchlorid zugefügt wurde. Um Benzamidiniumchlorid für die Chromatographie über p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose abzutrennen, wurde zunächst gegen 0,1 M NaAc, 0,1 M NaCl, 3 mM Na₃N, 0,1% (w/v) Triton X-100, pH 5,5 dialysiert und anschließend gegen 0,1 M Glycin, 0,1 M NaCl, 0,1% (w/v) Triton X-100, pH 2,9.

Die einzelnen Schritte der Aufarbeitung wurden elektrophoretisch verfolgt, wie unter D.3.3.1. beschrieben. Die Anfärbung der enzymatisch aktiven Banden erfolgte nach der Methode von Garner et al. (s. D.3.3.1.).

D.3.4.4. Inkubationsversuche zur Stabilität von Akrosin c

200 µg affinitätschromatographisch gereinigtes Akrosin mit einer spezifischen Aktivität von 95 U (BAEE)/mg wurde mit 1 ml 0,1 M NaAc, 0,1 M NaCl, 3 mM NaN_3 , 0,1% (w/v) Triton X-100 versetzt und Aliquote der Lösung mit CaCl_2 (Endkonzentration 50 mM), EDTA (20 mM) bzw. Benamidiniumchlorid (50 mM) versetzt. Die Proben wurden bei 4°C über mehrere Wochen inkubiert. Für die elektrophoretische Analyse wurde jeweils 10 µg Protein verwendet (s. D.3.3.1.1.). Die Proteinfärbung wurde mit Coomassie Brilliant Blue R 250 durchgeführt.

E. DISKUSSION

E.1. Isolierung

Ausgangsmaterial und Extraktion

Die Gewinnung von qualitativ zufriedenstellendem Ausgangsmaterial erwies sich als problematisch. Der Großteil der Spermaproben, die für die vorliegende Arbeit zur Verfügung standen, stammte von einem andrologischen Patientengut, nur ein kleiner Teil von gesunden Spendern. Die Spermaproben wurden dabei unabhängig vom Status des Spermiogramms (normal oder pathologisch) gesammelt. Ein weiterer qualitätsmindernder Faktor ist die ca. dreistündige Inkubation der Spermienproben post ejakulationem; sie ist zur Durchführung der andrologischen Untersuchungen notwendig. Erst danach wurde das Sperma bei -30°C gelagert. Angesichts der limitierten Mengen an Ausgangsmaterial mußte bei dieser Arbeit Sperma verwendet werden, das auf diese Weise über einen Zeitraum von bis zu vier Jahren gesammelt worden war. Alle genannten Faktoren dürften dazu beitragen, daß der Großteil der zur Verfügung stehenden Spermien erheblich geschädigt war.

Der Gelatinolyse-Test, der eine Beurteilung des proteolytischen Potentials individueller Spermatozoen erlaubt, fiel negativ aus. Es ist deshalb davon auszugehen, daß die Integrität der Akrosomen durch die genannten Prozeduren zerstört wurde, d.h., daß sowohl Akrosin und weitere akrosomale Proteine ins umgebende Medium ausgetreten waren, als auch Bestandteile des Seminalplasmas einschließlich der Akrosininhibitoren in das Akrosin eingedrungen waren. Neben morphologischen Veränderungen muß deshalb

auch mit enzymatischen Modifikationen gerechnet werden. Brown und Hartree (107) stellten z.B. bei der Isolierung von Akrosin aus Widderspermatozoen fest, daß Spermien, die bei -20°C über einige Monate gelagert waren, bedeutend mehr enzymatisch modifiziertes Akrosin enthalten hatten, als frisch ejakulierte Spermatozoen.

Optimale Ausbeuten in Bezug auf die Akrosin-Aktivität werden bei der sauren Extraktion in Gegenwart von Glycerin erzielt (110,122,124). Allerdings erwies sich bei Vorversuchen Humanakrosin als extrem labil bei pH 2,6, sodaß dieses Extraktionsverfahren für präparative Zwecke ausschied. Wurde dagegen bei pH 5,5 mit TritonX-100 extrahiert, so war Akrosin im Rohextrakt stabil.

Die extreme Instabilität der Akrosinlösungen bei pH 2,6 steht im Widerspruch zu Untersuchungen anderer Autoren, die bei niedrigem pH-Wert keine Stabilitätsprobleme hatten und sogar gereinigtes Akrosin in saurem Milieu (ca. pH 3,0) ohne Aktivitätsverluste aufbewahren konnten (4,111,112). Die Instabilität von Akrosin in meiner Rohpräparation ist wahrscheinlich Folge der eingangs beschriebenen Sammel- bzw. Lagerungsprobleme. Akrosin dürfte dabei partiell denaturiert und/oder proteolytisch modifiziert worden sein. Ein weiterer Faktor, der für die beobachtete Säurelabilität meiner Präparationen verantwortlich sein könnte, ist eine unvollständige Abtrennung des Seminalplasmas von den Spermienzellen. Diese Annahme wird durch die Befunde von Schleuning et al. (112) gestützt, die bei der Isolierung von Akrosin aus Seminalplasma beträchtliche Aktivitätsverluste bei saurem pH-Wert beobachteten. Die Ursache hierfür könnten saure Proteasen sein, die im Seminalplasma vorkommen und nicht quantitativ abgetrennt werden konnten, oder während der langen Lagerung der Spermien in das Akrosom eingedrungen sind.

Akrosinisolierung

Extrahiertes Akrosin wurde mit einem Zweistufen-Verfahren gereinigt. Chromatographie an SP-Sephadex C-50 ermöglichte die vollständige Abtrennung der Akrosin-Inhibitoren, die nachfolgende biospezifische Affinitätschromatographie an p-Aminobenzamidin-CH-Sepharose führte zu einer effektiven Abtrennung weiterer Fremdproteine. Die mit diesem Verfahren erhaltenen Akrosinpräparationen enthielten keine signifikanten Mengen an Fremdprotein mehr, wie durch elektrophoretische Analysen gezeigt werden konnte. Die Präparationen enthalten jedoch multiple Formen des Enzyms in wechselndem Mengenverhältnis. Die Gesamtausbeute nach beiden Stufen betrug 44% bei einer 762-fachen Anreicherung (bezogen auf die spezifische Aktivität). Damit liegt der erzielte Reinigungseffekt bedeutend über dem des Vierstufen-Verfahrens, das für Eberakrosin entwickelt wurde ($f = 161$) (4).

Die Auftrennung der multiplen Akrosin-Formen erfolgte durch präparative Elektrophorese, nachdem sich konventionelle chromatographische Verfahren als nicht geeignet erwiesen. Die totale Wiederfindungsrate für die drei Akrosin-Formen lag dabei bei 59%, einem für präparative Elektrophoresen akzeptablen Wert. Der Anteil der Einzelkomponente Akrosin c lag nach präparativer Elektrophorese, anschließender Entsalzung und Entfernung von Detergentien bei 21% bezogen auf das Ausgangsmaterial für die Elektrophorese. Die präparative Elektrophorese brachte zwar qualitativ akzeptable Ergebnisse, konnte aber in quantitativer Hinsicht nicht befriedigen, da pro Aufarbeitung nur ca. 1,0 mg Ausgangsmaterial eingesetzt werden konnte. Außerdem erwies sich die Prozedur als außerordentlich zeitaufwendig. Deshalb konnten nur geringe Mengen an Akrosin c bzw. Akrosin b und d präpariert werden. Zahlreiche Untersuchungen wurden mit dem Gemisch der multiplen Formen durchgeführt.

Die Schwierigkeit, genügend Akrosin in reiner Form zu isolieren, wird noch anschaulicher, wenn man die Akrosinmenge pro Eja-

kulat angibt. 2 - 4 μ g Akrosin sind pro Ejakulat extrahierbar, d.h., daß nach dem Zweistufen-Verfahren der Isolierung mit einer Ausbeute von ca. 44% noch ca. 1 - 2 μ g und nach der präparativen Elektrophorese noch ca. 0,2 - 0,4 μ g Akrosin isoliert werden können. Dieser Faktor liegt somit um 10^4 niedriger als bei der vergleichbaren Isolierung von Eberakrosin, wo 4 mg reines Akrosin pro Ejakulat gewonnen werden können(4).

E.2. Charakterisierung

Spezifische Aktivität

Nach der Affinitätschromatographie betrug die spezifische Aktivität ca. 120 U (BAEE/ADH)/mg Protein. Gilboa et al. (111) geben einen Wert von 44 U (BAEE)/mg und Schleuning et al. (112) 51,5 U (BAEE/ADH)/mg reines Humanakrosin an. Diese Unterschiede in der spezifischen Aktivität können durch die Anwesenheit von Triton X-100 in den Testpuffern bedingt sein. Nicht-ionische Detergentien wie Triton X-100 steigern beim Eberakrosin die Aktivität auf bis zu 260% des Ausgangswertes (14). Beim Humanakrosin konnte die Aktivierung durch Detergentien nicht quantifiziert werden, da Probleme bei der vollständigen Entfernung der Detergentien, die von der Reinigungsprozedur anwesend waren, auftraten. Eberakrosin konnte durch einfache Acetonfällung von den Detergentien abgetrennt werden (14); Humanakrosin wurde jedoch unter diesen Bedingungen vollständig inaktiviert. Zugabe von Detergentien zum inaktiven Produkt führte nicht zur gewünschten Reaktivierung. Die Entfernung der Detergentien durch Extraktion mit Essigsäureäthylester erwies sich als schonendere Methode. Dabei wurde nur ein geringer Aktivitätsverlust beobachtet. Vermutlich wird aber molekular gebundenes Triton X-100 durch diese Prozedur nicht entfernt.

Oligomerisation

Auto-Aggregation ist ein Phänomen, das bei globulären Proteinen wie Rinderserumalbumin (158) auftritt, vor allem aber bei Membranproteinen nach Entfernung der Detergentien oder Phospholipide (159). Oligomerisationsmuster wurden beim Akrosin vom Kaninchen (143) und Eber (130) festgestellt. Nach weitgehender Abtrennung von Detergentien werden auch bei Humanakrosin höhermolekulare Aggregate gefunden. Besonders bei sauren pH-Werten neigt Akrosin in Konzentrationen von >1 mg/ml zur Oligomerisation und zum Ausfallen. In der Disk-Elektrophorese sieht man dann im oberen Teil des Sammelgels eine hochmolekulare Bande, die offenbar nicht in das Gel einzuwandern vermag. Durch Zusatz von 6 M Harnstoff kann Akrosin wieder in Lösung gebracht werden; man erhält nun das übliche Bandenmuster in der Disk- oder SDS-Elektrophorese.

Molekulargewicht

Die SDS-Elektrophorese gilt als zuverlässiges Verfahren; Molekulargewichte einzelner Peptidketten zu bestimmen (9). Zu größeren Abweichungen kann es bei Glykoproteinen kommen, da sie eine verringerte SDS-Bindung aufweisen und dadurch eine geringere Mobilität im elektrischen Feld besitzen. Durch die verringerte Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel täuschen sie ein höheres Molekulargewicht vor (163). Bei basischen Proteinen wie z.B. Akrosin oder Histonen (164) kann es aufgrund der starken positiven Eigenladung der Moleküle ebenfalls zu einer verminderten Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld kommen.

Obgleich Akrosin ein basisches Glykoprotein darstellt, ist das in der SDS-Elektrophorese ermittelte Molekulargewicht offensichtlich real, wie am Beispiel von Eberakrosin demonstriert wurde. Die durch Verwendung unabhängiger Methoden (SDS-Elektrophorese, Active Site Titration, Ultrazentrifugation (4,165))

ermittelten Molekulargewichte stimmen hier gut überein.

Die Molekulargewichtsbestimmung für Akrosin c unter nicht reduzierten Bedingungen ergab in der SDS-Elektrophorese einen Wert von $\sim 39\ 000$. Vergleichbare Werte wurden für Humanakrosin A_β von Schleuning et al. (112), für Eberakrosin (4,165) und für Widderakrosin (107) gefunden. Die N-terminale Analyse von Eberakrosin mit einem Molekulargewicht von $38\ 000$ zeigte, daß dieses einkettige Molekül offenbar der aktivierten Form einer Serinproteinase entspricht (129). Somit dürfte Akrosin c die aktive Form von Humanakrosin darstellen. Allerdings wurde für reduziertes und carboxymethyliertes Akrosin c in der SDS-Elektrophorese ein Peptidmuster mit Molekulargewichten von $20\ 000$, $16\ 000$, $14\ 000$, und $12\ 000$ gefunden. Humanakrosin c besitzt also mehrere interne Spaltstellen; die entsprechenden Peptide werden über Disulfidbrücken verknüpft. Vermutlich tritt die (Auto-) Proteolyse von Humanakrosin bereits während der Sammlung und Lagerung auf; Akrosin c ist nämlich die Hauptform des Rohextraktes. Proteolytische Spaltungen finden aber u.U. auch noch während der Isolierung statt. Schleuning et al. (125) berichten z.B., daß Eberakrosin, das aus gelagerten Spermier isoliert wurde, bereits gespaltene Peptidbindungen besitzt und unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-Elektrophorese Molekülfragmente ergibt.

Für die beiden anderen aktiven Formen, Akrosin b und Akrosin d, wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von $53\ 000$ und $34\ 000$ bestimmt. Schleuning et al. (112) bestimmten die Molekulargewichte zu $64\ 000$ (A_α) und $25\ 000$ (A_γ). Gilboa et al. (111) geben für Humanakrosin ein Molekulargewicht von $75\ 000$ (SDS-Elektrophorese) an; Tobias et al. (113) beschrieben drei Enzym-Formen mit Molekulargewichten von $53\ 000$, $40 - 42\ 000$ und $26 - 29\ 000$ (Gelchromatographie). In diesen Fällen wurden aber keine reinen Präparate verwendet.

Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäurezusammensetzung von Humanakrosin c weist große Ähnlichkeit mit der Zusammensetzung von Eber- und Widderakrosin auf (s. Tabelle 6). Der Schluß liegt deshalb nahe, daß Akrosinmoleküle unterschiedlicher Spezies große Strukturhomo-logien besitzen. Eine Ähnlichkeit der Aminosäureanalysen für Humanakrosin c und Trypsin (Mensch) war dagegen nicht zu beobachten (Tab.6). Andererseits wurde für die niedermolekularen Formen Humanakrosin A (MG 25000)(108,112) und Kaninchenakrosin (MG 22 000) eine große Ähnlichkeit in der Aminosäurezusammen-setzung mit menschlichem Trypsin berichtet.

In den Hydrolysen von Akrosinpräparationen, die durch präpara-tive Elektrophorese gewonnen wurden, lag Cystein und z.T. auch Methionin in der oxidierten Form (Cysteinsäure bzw. Methionin-sulfon) vor. Alfageme et al. (151) stellten früher fest, daß es während der präparativen Elektrophorese, besonders bei der Ver-wendung Triton-haltiger Gele, leicht zur Oxidation von Cystein und Methionin kommt. Die Vermeidung dieser Oxidationsvorgänge ist aber methodisch recht aufwendig. Mardian et al. (152) fan-den z.B., daß eine fünftägige Vorelektrophorese des Gels unter reduzierenden Bedingungen die Aminosäure-Oxidation verhindert.

Der Polaritätsindex nach Capaldi (150) beträgt für Humanakrosin 43,3%. Der Index gibt den prozentualen Anteil der polaren Ami-nosäuren Asx, Glx, Lys, Ser, Arg, Thr und His an. Bei löslichen Proteinen beträgt er durchschnittlich 47%; bei integralen Mem-branproteinen liegt er im allgemeinen unter 40%. Akrosin liegt mit seinem Polaritätsindex im Grenzbereich zwischen löslichen Proteinen und den integralen Membranproteinen und kann somit ein peripheres Protein der inneren akrosomalen Membran darstel-len, wie von Hartree (107) bzw. Müller-Esterl (14) postuliert wurde.

Tabelle 6 Aminosäurezusammensetzung (mol Aminosäure/mol Protein) von Humanakrosin c, Eberakrosin (4), Widderakrosin (107) und von menschlichem Trypsin (162)

Aminosäure	Humanakrosin	Eberakrosin	Widderakrosin	menschl. Trypsin
Asp	31	23	24	21
Thr	19	20	19	10
Ser	26	18	25	24
Glu	31	27	29	21
Pro	31	40	36	9
Gly	38	34	31	20
Ala	26	19	25	13
Cys	8	8	12	4
Val	23	24	26	16
Met	4	6	4	1
Ile	21	17	18	12
Leu	21	21	21	12
Tyr	10	10	10	7
Phe	11	11	10	4
His	7	6	9	3
Lys	17	16	16	11
Arg	19	25	25	6
Trp	n.d.	3	3	3
Total	343	328	343	197

E.3. Multiple Formen

Das Auftreten von multiplen Akrosinformen ist bei verschiedenen Spezies, so z.B. bei Eber (134,136), Bullen (137,160), Widder (137,160) und Menschen (112,113,154) beschrieben worden. Das Auftreten multipler Formen eines Enzyms kann vielfältige Ursachen haben:

1. Genetisch determinierten Polymorphismus;
2. Unterschiede im Kohlenhydratanteil (161);
3. proteolytische Modifikation (107,130);
4. Zwischenstufen der Proenzymaktivierung (112,134,136,137,160);
5. Assoziation mit anderen Proteinen (144);
6. Oligomerisation (130).

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten sprechen dafür, daß die multiplen Formen von Humanakrosin Zwischenstufen einer Proenzymaktivierung sind bzw. proteolytisch modifizierten Enzymen (begrenzter Abbau) entsprechen. Aufgrund der ähnlichen Aminosäurezusammensetzung (Tab.6) und den nahezu identischen Molekulargewichten von Humanakrosin c (MG 39 000) und Eberakrosin (MG 38 000) kann man davon ausgehen, daß es sich bei diesen beiden Proteinen um analoge Formen zweier Spezies handelt.

Die N-terminale Sequenz von Eberakrosin weist alle typischen Strukturmerkmale einer aktiven Serinproteinase auf (129). Der Analogieschluß liegt nahe, daß Akrosin c die aktivierte Form von Humanakrosin darstellt. Im Unterschied zu Eberakrosin, das sich nach Reduktion und Carboxymethylierung als einkettiges Protein mit einem Molekulargewicht von 38 000 darstellen läßt, besteht Humanakrosin c aber aus mehreren Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken kovalent verbunden sind. Es ist deshalb naheliegend anzunehmen, daß Akrosin c durch unspezifische Proteolyse während Lagerung und Isolierung entstanden ist. Für diese Beobachtung spricht auch, daß die Fragmentierung von Akrosin c durch DFP-Behandlung partiell unterdrückt wird.

Weiterhin spricht für diese Annahme, daß Akrosin c in der SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen je nach verwendeter Präparation ein quantitativ unterschiedliches Fragmentierungsmuster aufweist. Da mindestens vier Fragmente verschiedener Molekülgröße gefunden wurden, ist davon auszugehen, daß Akrosin c Mikroheterogenitäten in den internen Spaltstellen aufweist. Ein einkettiges Protein vom Molekulargewicht 39 000, das den Vorläufer der proteolytisch modifizierten Enzymformen darstellen würde, konnte bisher von mir nicht gefunden werden.

Ausgehend von der Hypothese, daß Akrosin c die aktivierte Form von Humanakrosin repräsentiert, kann man Akrosin b bzw. Akrosin d als höhermolekulare Vorstufe bzw. als niedermolekulares Abbauprodukt von Akrosin c betrachten. Akrosin b besitzt ein Molekulargewicht von 53 000; Inkubationsversuche bei verschiedenen pH-Werten lassen den Schluß zu, daß Akrosin b durch limitierte Proteolyse in Akrosin c überführt wird. Für Eberakrosin wurden inaktive Proenzyme mit einem Molekulargewicht von 53 000 und 55 000 beschrieben (134).

Es stellt sich nun die Frage, ob Akrosin b die Proenzymform des Humanakrosins darstellt. Gegen diese Vermutung spricht jedoch die Beobachtung, daß Akrosin b-haltige Präparationen stets volle Aktivität besitzen, also nicht aktivierbar sind. Auch wurde nach Umwandlung von Akrosin b in Akrosin c keine Aktivitätszunahme beobachtet. In Analogie zur Aktivierungskaskade plasmatischer Enzyme wie Plasmin und Thrombin möchte ich deshalb postulieren, daß Akrosin b ein Zwischenprodukt der Proenzym-Aktivierung darstellt, das enzymatisch bereits aktiv ist.

Akrosin d wird als Endprodukt der Umwandlung von Akrosin b bzw. Akrosin c gebildet. Offensichtlich entsteht Akrosin d direkt aus Akrosin c durch limitierte Proteolyse, da Benzamidin die Transformation Akrosin c in Akrosin d inhibiert. Ein autoproteolytischer Abbau von Akrosin c, wie er auch bei Eberakrosin beobachtet wurde, ist weiterhin denkbar. Akrosin d würde somit ein enzymatisch aktives Abbauprodukt von Akrosin c darstellen.

Die Natur von Akrosin a ist derzeit noch unklar. Ein Molekulargewicht dieser Enzymform konnte bisher noch nicht zugeordnet werden. Inkubationsversuche sprechen dafür, daß Akrosin a in Akrosin b bzw. Akrosin c transformiert wird. Akrosin a könnte eine höhermolekulare Akrosinvorstufe, ein Enzym-Inhibitor-Komplex mit einem bis jetzt nicht bekannten temporären Inhibitor oder ein Assoziat von Akrosin mit einem Begleitprotein darstellen. Eine definierte Zuordnung ist mit den bisher vorliegenden Daten nicht möglich.

Faßt man die Befunde über die multiplen Formen von Humanakrosin zusammen, so läßt sich sagen, daß die multiplen Formen Produkte einer Transformationskaskade $\text{Akrosin } a \rightarrow b \rightarrow c \rightarrow d$ darstellen. Ein definierter Beweis für diese Annahme kann nur durch die Reindarstellung einer Vorstufe und die in vitro-Transformation in die Folgeprodukte erbracht werden.

Eine Identifizierung der Produkte mit Bestimmung der N-terminalen Sequenz würde eine Lösung des Problems darstellen. Beim Menschen wird dies wohl nur schwer durchführbar sein, da das benötigte biologische Material nur im begrenzten Umfang zur Verfügung steht.

LITERATURVEREICHNIS

- 1 Fink, E., Schiessler, H., Arnhold, M. und Fritz, H. (1972) Z.physiol.Chem. 353, 1633-1637
- 2 Ziegenhorn, J., Senn, M., Bücher, T. (1976) Clin.Chem. 22, 151-160
- 3 Schleuning, W.-D., Fritz, H. (1975) Meth.Enzymol. 45, 330-342
- 4 Müller-Esterl, W., Kupfer, S., Fritz, H. (1980) Z.physiol.Chem. 361, 1811-1821
- 5 Axén, R., Porath, J., Ernback, S. (1967) Nature 214, 1302-1304
- 6 Maurer, H.R. (1971) Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, S. 46-47, Walter de Gruyter, Berlin, New York
- 7 Weber, K., Pringle, M. und Osborn, M. (1970) in Methods in Enzymology (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Hrsgb.) Vol. XXVI, S. 3-27, Academic Press, New York, London
- 8 Garner, D.L. (1975) Anal. Biochem. 67, 688-694
- 9 Weber, K., Osborn, M. (1975) in The Proteins (Neurath, H., Hill, R., Hrsgb.) Vol.1, 179-223, Academic Press, New York
- 10 Laemmli, U.K. (1970) Nature (London) 227, 680-685
- 11 Spackman, D.H., Moore, W.H. (1958) Anal.Chem. 30, 1190
- 12 Hirs, C.H.W. (1956) J.Biol.Chem. 219, 611-621
- 13 Garewel, H.S. (1973) Anal.Biochem. 54, 319-324
- 14 Müller-Esterl, W., Fritz, H. (1980) Z.physiol.Chem. 361, 1673-1682
- 15 Fiedler, F., Geiger, R., Hirschauer, Ch., Leysath, G. (1978) Z.physiol.Chem. 259, 1667-1673
- 16 Dawson, R.M.C., Scott, T.W. (1964) Nature 202, 292-293

- 17 Crogan, D.E., Mayer, D.T., Sikes, J.D. (1966) *Reprod.Fertil.* 12, 431-436
- 18 Quinn, P.J., White, J.G. (1967) *Austr.J.Biol.Sci.* 20, 1205-1215
- 19 Scott, T.W., Vogelmayr, J.K., Setchell, B.P. (1967) *Biochem. J.* 102, 456-461
- 20 White, J.G. (1973) in *Schering Workshop on Contraception: The Masculin Gender* (Raspe, G. Hrsgb.) *Advances in the Bio-sciences Vol.10*, 157-168, Pergamon Press, Viewig
- 21 Turner, C., MacLaughlin, J., Smith, B.P. (1975) *J.Reprod. Fertil.* 45, 1-8
- 22 Cooper, G.W., Bedford, J.M. (1971) *J.Reprod.Fertil.* 25, 431-436
- 23 Bedford, J.M., Calvin, H., Cooper, C.W. (1973) *J.Reprod. Fertil. suppl.* 18, 199
- 24 Allison, A., Hartree, E.F. (1969) *J.Reprod.Fertil.* 21, 501
- 25 Morton, D.B. (1976) Lysosomal enzymes in mammalian spermatozoa, in: J.T. Dingle, R.T. Dean (Hrsgb.) *Lysosomes in Biology and Pathology*, Vol. 5, 203-247
- 26 Schill, W.-B., Haberland, G.L. (1974) *Z.physiol.Chem.* 355, 229-231
- 27 Schill, W.-B., Haberland, G.L. (1974) *Hautarzt* 25, 245
- 28 Schill, W.-B., Braun-Falco, O., Haberland, G.L. (1974) *Int. J.Fertil.* 19, 163-167
- 29 Frey, E.K., Kraut, H., Werle, E. (1968): *Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren*, F. Enke, Stuttgart
- 30 Blandau, R.J. (1970) in: *The Mammalian oviduct* (Hafez, E.S. E., Blandau, R.J. Hrsgb.) 129-162, University of Chicago Press, Chicago
- 31 Schill, W.-B., Haberland, G.L. (1975) *Klin.Wschr.* 53, 73-79
- 32 Palm, S., Schill, W.-B., Wallner, O., Prinzen, R., Fritz, H. (1976) in: *Kinins: Pharmacodynamics and Biological Roles* (Sicuteri, F., Back, N., Haberland, G.L. Hrsgb.), 271-279
- 33 Schumacher, G.F.B., Zaneveld, L.J.D. (1974) in: *Proteinase Inhibitors* (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J., Truscheit, E. Hrsgb.), 178-186, Springer Verlag, Berlin

- 34 Blandau, R.J. (1973) in: The biology of the cervix (Blandau, R.J., Moghissi, K.S. Hrsgb.) 285-304, University of Chicago Press, Chicago
- 35 Chang, M.C. (1951) Nature 168, 697-698
- 36 Austin, C.R. (1951) Austr.J.Sci.Res. B4, 581
Austin, C.R. (1969) Adv.Biosci. 4, 5
- 37 Gwatkin, R.B.L. (1976) in: The Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development (Poste, G., Nicolson, G.L. Hrsgb.) 1-54, Elsevier/North-Holland, Biochemical Press
- 38 Kirton, K.T. Hafs, H.D. (1965) Science 150, 618-619
- 39 Gwatkin, R.B.L., Hutchinson, C.F. (1971) Nature 229, 343-344
- 40 Johnson, W.L., Hunter, A.G. (1972) Biol.Reprod. 7, 332-340
- 41 Gordon, M., Dandekar, P.V., Bartoszewicz, W. (1974) J.Reprod. Fertil. 36, 211-214
- 42 Gordon, M., Dandekar, P.V., Bartoszewicz, W. (1975) J.Ultrastruct.Res. 50, 199-207
- 43 Vaidya, R.A., Glass, R.H., Dandekar, P., Johnson, K. (1971) J.Reprod.Fertil. 24, 299-301
- 44 Bedford, J.M., Chang, M.C. (1962) Nature 193, 898
- 45 Poste, G. (1972) Int.Rev.Cytol. 33, 157-252
- 46 Poste, G., Allison, A.C. (1973) Biochim.Biophys.Acta 300, 421-465
- 47 Barros, C., Austin, C.R. (1967) J.Exp.Zool. 166, 317-323
- 48 Bedford, J.M. (1968) Am.J.Anat. 123, 329-358
- 49 Franklin, L.E., Barros, C., Fussell, E.N. (1970) Biol.Reprod. 3, 180-200
- 50 Yanagimachi, R., (1970) Biol.Reprod. 3, 147-153
- 51 Yanagimachi, R. (1970) J.Reprod.Fertil. 23, 193-196
- 52 Bedford, J.M. (1972) in: Reproductive Biology (Balni, H., Glasser, S. Hrsgb.) 338-392, Excerpta Medica, Amsterdam
- 53 Thompson, R.S., Moore Smith, D., Zamboni, L. (1974) Fertil. Steril. 25, 222-249

- 54 Yanagimachi, R., Usui, N. (1974) Exp.Cell.Res. 89, 161-174
- 55 Rogers, J., Yanagimachi, R. (1975) J.Reprod.Fertil. 44, 135-138
- 56 Lui, Ch.W., Meizel, S. (1979) J.Exp.Zool. 207, 173-185
- 57 Shams-Borhan, G. unveröff. Ergebnisse
- 58 Meizel, S., Lui, Ch.W. (1976) J.Exp.Zool. 195, 137-144
- 59 Green, D.P.L. (1976) J.Physiol. 263, 281p
- 60 Gorden, M. (1973) J.Exp.Zool. 185, 111-123
- 61 Green, D.P.L. (1978) J.Cell.Sci. 32, 137-151
- 62 McRorie, R.A., Williams, W.L. (1974) Ann.Rev.Biochem. 43, 777-803
- 63 Metz, C.B. (1973) Fed.Proc. 32, 2057
- 64 Brunish, R., Högberg, B. (1960) C.R. des Trav. du Laboratoire Carlsberg 32, 35
- 65 Soru, E., Ionescu-Stoian, F. (1963) Biochim.Biophys.Acta 69, 538
- 66 Borders, C.L., Raftery, M.A. (1968) J.Biol.Chem. 243, 3756
- 67 Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L., Schumacher, G.F.B. (1973) J.Biol.Chem. 248, 564
- 68 Yang, C.H., Srivastava, P.N. (1975) J.Biol.Chem. 250, 79
- 69 Morton, D.B. (1973) Trans.Biochem.Soc. 1, 385
- 70 Yang, C.H., Srivastava, P.N. (1974) J.Reprod.Fertil. 37, 17
- 71 Stambaugh, R., Smith, M. (1973) J.Reprod.Fertil. 35, 127
- 72 Bollet, A.J., Banner, W.M., Nance, J.L. (1963) J.Biol.Chem. 238, 3522
- 73 Aronson, N.N., Davidson, E.A. (1967) J.Biol.Chem. 242, 441
- 74 De Salegui, N., Plonska, H., Pigman, W. (1967) Arch.Biochem. Biophys. 121, 548
- 75 Zaneveld, L.J.D., Williams, W.L. (1970) Biol.Reprod. 2, 363
- 76 Tillmann, W.L. (1972) Enzymology of spermatozoon penetration of mammalian ova. MS thesis Univ. Georgia, Athens, 105 pp

- 77 Gould, K., Zaneveld, L.J.D., Srivastava, P.N., Williams, W. L. (1971) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 136, 6
- 78 Menino, A.R., Wright, R.W. (1979) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 160, 449-452
- 79 Stambaugh, R., Buckley, J. (1969) J.Reprod.Fertil. 19, 423-432
- 80 Zaneveld, L.J.D., Robertson, R.T., Williams, W.L. (1970) FEBS Lett. 11, 345
- 81 Zaneveld, L.J.D., Robertson, R.T., Kessler, M., Srivastava, P.N., Williams, W.L. (1970) Fed.Proc. 29, 644
- 82 Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L., Robertson, R.T., Williams, W.L. (1971) in: Proteinase Inhibitors (Fritz, H., Tschesche, H. Hrsgb.) Walter de Gruyter, New York
- 83 Zaneveld, L.J.D., Robertson, R.T., Kessler, M., Williams, W. L. (1971) J.Reprod.Fertil. 25, 387
- 84 Chang, M.C., Hunt, D.M. (1956) Exp.Cell.Res. 11, 497
- 85 Bedford, J.M., Cross, N.L. (1978) J.Reprod.Fertil. 54, 385-392
- 86 Gwatkin, R.B.L. "Fertilization Mechanisms in Man and Mammals", Plenum Press, New York, London (1977)
- 87 Hartmann, J.F., Gwatkin, R.B.L., Hutchison, C.F. (1972) Proc. Nat.Acad.Sci. 69, 2767-2769
- 88 Hartmann, J.F., Hutchison, C.F. (1974) J.Reprod.Fertil. 36, 49-57
- 89 Hartmann, J.F., Gwatkin, R.B.L. (1971) Nature 234, 479-481
- 90 Gwatkin, R.B.L., Wudl, L., Hartree, E.F., Fuik, E. (1977) J.Reprod.Fertil. 50, 359-361
- 91 Gwatkin, R.B.L., Carter, H.W., Patterson, H. (1976) in: Scanning Electron Microscopy Vol. 2, Pt.6, 379-384 (Johari, H., Decker, R.P. Hrsgb.) IIT Res.Inst., Chicago, Illinois
- 92 Marushige, Y., Marushige, K. (1975) Biochim. Biophys.Acta 403, 180-191
- 93 Marushige, Y., Marushige, K. (1978) Biochim.Biophys.Acta 519, 1-22
- 94 Young, R.J. (1979) Biol.Reprod. 20, 1001-1004

- 95 Ho, J.J.L., Meizel, S. (1976) *Comp.Biochem.Physiol.* 54B, 213-218
- 96 Palmer, M.B., Howarth, B. (1973) *J.Reprod.Fertil.* 35, 7
- 97 Penn, A., Gledhill, B.L. (1972) *Exp.Cell.Res.* 74, 285-288
- 98 Elison, R.P. (1974) *Biol.Reprod.* 11, 406
- 99 Levine, A.E., Walsh, K.A., Fodor, E.J.B. (1978) *Dev.Biol.* 63, 299-306
- 100 Levine, A.E., Walsh, K.A. (1980) *J.Biol.Chem.* 255, 4814-4820
- 101 Fritz, H., Schleuning, W.D., Schiessler, H., Schill, W.-B., Wendt, V., Winkler, G. (1975) in: *Proteases and Biological Control* (Reich, E., Rifkin, D.B., Shaw, E. Hrsgb.), 715-735, Cold Spring Harbor Laboratory
- 102 Schleuning, W.D., Schiessler, H., Fritz, H. (1973) *Z.physiol.Chem.* 354, 550-554
- 103 Polakoski, K.L., McRorie, R.A., Williams, W.L. (1973) *J.Biol.Chem.* 248, 8178-8182
- 104 Garner, D.L. (1973) *Biol.Reprod.* 9, 71
- 105 Garner, D.L. Cullison, R.F. (1974) *J.Chromatogr.* 92, 445-449
- 106 Morton, D.B.M. (1977) in: *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues* (Barrett, A.J. Hrsgb.) 445-500, Elsevier/North Holland, Biomedical Press
- 107 Brown, C.R., Hartree, E.F. (1978) *Biochem.J.* 175, 227-238
- 108 Stambaugh, R., Smith, M. (1974) *Science* 186, 745-746
- 109 Mukerji, S.K., Meizel, S. (1979) *J.Biol.Chem.* 254, 11721-11728
- 110 Fritz, H., Förg-Brey, B., Fink, E., Meier, M., Schiessler, H., Schirren, C. (1972) *Z.physiol.Chem.* 353, 1943-1949
- 111 Gilboa, E., Elkana, Y., Rigbi, M. (1973) *Eur.J.Biochem.* 39, 85-92
- 112 Schleuning, W.D., Hell, R., Fritz, H. (1976) *Z.physiol.Chem.* 357, 855-865
- 113 Tobias, P.S., Schumacher, G.F.B. (1978) 11. Ann.Meeting, Soc.for the Study of Reprod. 14A

- 114 Brown, C.R., Hartree, E.F. (1974) J.Reprod.Fertil. 36, 195
- 115 Garner, D.L., Easton, M.P., Munson, M.E., Doane, M.A. (1975) J.Exp.Zool. 191, 127-131
- 116 Garner, D.L. Easton, M.P. (1977) J.Exp.Zool. 200, 157-162
- 117 Schill, W.-B., Schleuning, W.D., Fritz, H., Wendt, V. (1975) Naturwissenschaften 62, 540-541
- 118 Morton, D.B. (1975) J.Reprod.Fertil. 45, 375-378
- 119 Stambaugh, R., Buckley, J. (1972) Fert.Steril. 23, 348-353
- 120 Green, D.P.L., Hockaday, A.R. (1978) J.Cell Sci. 32, 177-184
- 121 Shams-Borhan, G., Huneau, D., Fléchon, J.E. (1979) Exp. Zool. 209, 143-149
- 122 Schill, W.-B. (1974) Z.physiol.Chem. 355, 257
- 123 Polakoski, K.L., Zanefeld, L.J.D., Williams, W.L. (1972) Biol.Reprod. 6, 23
- 124 Goodpasture, J.C., Polakoski, K.L., Zanefeld, L.J.D. (1980) J.Aurol. 1, 16-27
- 125 Schleuning, W.D., Fritz, H. (1974) Z.physiol.Chem. 355, 125-130
- 126 Schiessler, H., Schleuning, W.D., Fritz, H. (1975) Z.physiol. Chem. 356, 1931-1936
- 127 Polakoski, K.L., McRorie, R.A. (1973) J.Biol.Chem. 248, 8183-8188
- 128 Schill, W.-B. (1973) Arch.Dermatol.Forsch. 248, 257
- 129 Fock-Nüzel, R., Lottspeich, F., Henschen, A., Müller-Esterl, W., Fritz, H. (1980) Z.physiol.Chem. 361, 1823
- 130 Müller-Esterl, W., Zippel, B., Fritz, H. (1980) Z.physiol. Chem. 361, 1381-1388
- 131 Stambaugh, R. (1978) Gam.Res. 1, 65-85
- 132 Meizel, S., Mukerji, S.K. (1975) Biol.Reprod. 13, 83-93
- 133 Meizel, S., Mukerij, S.K. (1976) Biol.Reprod. 14, 444-450
- 134 Polakoski, K.L., Parrish, R.F. (1977) J.Biol.Chem. 252, 1888-1894

- 135 Polakoski, K.L., Zahler, W.L., Paulson, J.D. (1977) *Fertil. Steril.* 28, 668-670
- 136 Schleuning, W.D., Hell, R., Fritz, H. (1976) *Z.physiol.Chem.* 357, 207-212
- 137 Brown, C.R., Harrison, R.A.P. (1978) *Biochim.Biophys.Acta* 526, 202-217
- 138 Wendt, V., Leidl, W., Fritz, H. (1975) *Z.physiol.Chem.* 356, 315
- 139 Brown, C.R., Hartree, E.F. (1976) *Z.physiol.Chem.* 357, 57-65
- 140 Parrish, R.F., Straus, J.W., Polakoski, K.L., Dombrose, F.A. (1978) *Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 75, 149-152
- 141 Brown, C.R., Hartree, E.F. (1975) *Z.physiol.Chem.* 356, 1909-1913
- 142 Brown, C.R., Hartree, E.F. (1976) *Z.physiol.Chem.* 357, 57-65
- 143 Mukerji, S.K., Meizel, S. (1975) *Arch.Biochem.Biophys.* 168, 720-721
- 144 Parrish, R.F., Polakoski, K.L. (1978) *Anal.Biochem.* 87, 108-113
- 145 Rasmussen, J., Albrechtsen, O.K. (1960) *Fert.Steril.* 11, 264-277
- 146 Fritz, H., Schiessler, H., Schill, W.-B., Tschesche, H., Heimburger, N., Wallner, O. (1975) in: *Proteases and Biological Control* (Reich, E., Rifkin, D.B., Shaw, E. Hrsgb.) 737-766, Cold Spring Harbor Laboratory
- 147 Fink, E., Klein, G., Hammer, F., Müller-Bardorff, G., Fritz, H. (1971) in: *Proc.Int.Res.Conf. on Proteinase Inhibitors München 1970* (Fritz, H., Tschesche, H. Hrsgb.) 225-235, Walter de Gruyter, New York
- 148 Schill, W.-B., Feifel, M., Fritz, H., Hammerstein, J. (1981) *Int.J.Androl.* 4, 25-38
- 149 Leuchtgens, H., Dissertation, in Vorbereitung
- 150 Capaldi, R.A., Vanderkooi, G. (1972) *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 69, 930-932
- 151 Alfageme, C.R., Zweidler, A., Mahowald, A., Cohen, L.H. (1974) *J.Biol.Chem.* 249, 3729
- 152 Mardian, J.K.W., Isenberg, J. (1978) *Anal.Biochem.* 91, 1-12

- 153 Radola, B.J. (1973) Biochim.Biophys.Acta 295, 412-428
- 154 Tobias, P.S., Schumacher, G.F.B. (1977) Biochem.Biophys. Res.Comm. 74, 434-439
- 155 Schiessler, H. (1976) Fortschr.Androl. 2, 45-102
- 156 Wilkinson, G.N. (1961) Biochem.J. 80, 324-332
- 157 Schill, W.-B., Fritz, H. (1975) Z.physiol.Chem. 356, 83-90
- 158 Thornn, W. (1971) Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 2, 3-11
- 159 Tanford, C., Reynolds, J.A. (1976) Biochim.Biophys.Acta 457, 133-170
- 160 Shams-Borhan, G., Schleuning, W.D., Tschesche, H., Fritz, H. (1976) Z.physiol.Chem. 357, 667-671
- 161 Schleuning, W.D., Hell, R., Schiessler, H., Fritz, H. (1975) Z.physiol.Chem. 356, 1915-1921
- 162 Travis, J., Roberts, R.C. (1969) Biochem. 8, 2884
- 163 Pitt-Rivers, R., Impiombato, F.S.A. (1968) Biochem.J. 109, 825
- 164 Reynolds, J.A., Tanford, C. (1970) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 66, 1002
- 165 Schleuning, W.D., Kolb, H.J., Hell, R., Fritz, H. (1975) Z.physiol.Chem. 356, 1923-1929
- 166 Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L., Schumacher, G.F.B. (1975) in: Proteases and Biological Control(Reich, E., Rifkin, D.B., Shaw, E. Hrsgb.) 715-735, Cold Spring Harbor Laboratory
- 167 Bhattacharyya, A.K., Zaneveld, L.J.D., Dragoje, B.M., Schumacher, G.F.B., Travis, J. (1976) J.Reprod.Fertil. 47, 97-100
- 168 Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L., Williams, W.L. (1972) Science 177, 702-703

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ac	Acetat
Ac-Phe-Arg-OEt	N ^α -Äthyl-L-phenylalanyl-L-arginin-äthylester-Acetat
ADH	Alkoholdehydrogenase
Bz-Arg-NHNaph	N ^α -Benzoyl-DL-arginin-β-naphthylamid Hydrochlorid
Bz-Arg-NHNp bzw. BAPA	N ^α -Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid
Bz-Arg-OEt bzw. BAEE	N ^α -Benzoyl-L-arginin-äthylester
CH	Carboxyhexyl-
CM	Carboxymethyl-
DFP	Diisopropylfluorphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
HUSI	Human-Seminalplasma-Inhibitor
IU bzw. mIU	Inhibitor-Unit bzw. milli-Inhibitor-Unit
U bzw. mU	Unit bzw. milli-Unit
M.G.	Molekulargewicht
NAD ⁺	β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NPGb	p-Nitrophenyl-p'-guanidino-benzoat
SBTI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SP	Sulfopropyl-
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylenäthylendiamin
TLCK	N ^α -Tosyl-L-Lysyl-chlormethylketon
Tos-Arg-OMe	N ^α -Tosyl-L-arginin-methylesterhydrochlorid
TRA	Triäthanolamin

LEBENS LAUF

- 18.7.1946 geboren in München als zweite Tochter von Georg Meister und Katharina Meister, geb. Husel
- 1952 - 1959 Besuch der Städtischen Volksschule an der Gebelestraße in München
- 1959 - 1963 Besuch der Städtischen Mittelschule am Salvatorplatz in München
- 1963 - 1966 Ausbildung zur Chemotechnikerin an der Chemischule Dr. Elhardt in München
- 1966 - 1969 Beschäftigung als Chemotechnikerin am Max-Planck-Institut für Biochemie in München
- 1968 - 1969 - am Institut für Tierphysiologie an der Universität München und
- 1969 - 1971 am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München
- 15.6.1971 Ablegung der Begabtenprüfung am Bayerischen Staatsministerium für Unterricht und Kultus
- 12.11.1971 Eheschließung mit Ralf Mindermann
- seit November 1971 Studium der Chemie an der Universität München
- 3.5.1974 Diplom-Vorprüfung
- Juli 1976 Diplom-Hauptprüfung
- 1.10.76 - 1.10.77 Diplomarbeit an der Universität München über "Methodische Untersuchungen zur Isolierung von niedermolekularem Kininogen aus Humanplasma und zur Charakterisierung der Kininogenaseaktivität aus menschlichen Leukozyten"
- 9.12.1977 Geburt unseres Sohnes Florian
- ab 1.6.1978 Durchführung der vorliegenden Arbeit unter der Leitung von Prof.Dr. H.Fritz an der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik der Universität München
- 2.6.1980 Geburt unseres Sohnes Johannes

